



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

UTILIZAÇÃO DE EXTRACTO DE *STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS* EM  
TESTES ALERGOLÓGICOS CUTÂNEOS NO CÃO – UM ESTUDO PRELIMINAR

Diana Marisa Cardoso Mascarenhas

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia  
Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier Félix  
Lourenço  
Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de  
Oliveira

ORIENTADOR

Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier Félix  
Lourenço

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba

2014

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

UTILIZAÇÃO DE EXTRACTO DE *STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS* EM  
TESTES ALERGOLÓGICOS CUTÂNEOS NO CÃO – UM ESTUDO PRELIMINAR

Diana Marisa Cardoso Mascarenhas

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia  
Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier Félix  
Lourenço  
Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de  
Oliveira

ORIENTADOR

Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier Félix  
Lourenço

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba

2014

LISBOA

---

“Aqueles que amamos nunca morrem”,  
ficam para sempre gravados no nosso coração.  
Dedicado a ti, Kiara.

## AGRADECIMENTOS

---

Maior desafio que escrever uma tese é ter que condensar em pouco mais de uma página um profundo agradecimento a todas as pessoas que permitiram que eu concretizasse o meu sonho de ser Médica Veterinária e às pessoas que me acompanharam durante este longo percurso académico.

Começo por agradecer aos meus pais pelo apoio incondicional, por terem sempre acreditado em mim e por me terem permitido ser aquilo que eu sempre quis. Ao meu Avô e à minha Avó um muito obrigado, porque sei que só concretizei este sonho porque vocês estavam ao meu lado e me ajudaram. Ao meu querido irmão, porque mesmo quando nos damos mal, sei que tu queres sempre que eu seja feliz! A toda a minha família (tios e primos) porque posso sempre contar com vocês.

Quero deixar um agradecimento especial às minhas orientadoras, à Professora Dr.<sup>a</sup> Ana Mafalda Lourenço pelos conhecimentos adquiridos na área da dermatologia durante o estágio e pelo apoio e orientação nos momentos de “desorientação” na realização da dissertação, à Professora Dr.<sup>a</sup> Constança Matias Ferreira Pomba pelo apoio, disponibilidade e dedicação. É fundamental também agradecer à Dr.<sup>a</sup> Natacha Couto por ser a impulsionadora deste projeto e pela dedicação demonstrada em todas as etapas, pois sei que foste fundamental para a realização deste estudo. À Eng.<sup>a</sup> Adriana Belas pela ajuda na fase laboratorial do projeto.

A todo o corpo clínico do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (médicos, auxiliares e enfermeiros) um obrigado gigantesco, em especial ao Dr. Gonçalo Vicente, ao Dr. Ricardo Ferreira, ao Dr. Ricardo Marques, à Dr.<sup>a</sup> Leonor Iglésias, à Dr.<sup>a</sup> Inês Marques, à Dr.<sup>a</sup> Mariana Pereira e à Dr.<sup>a</sup> Rute Teixeira pela boa disposição no trabalho, pelos conhecimentos transmitidos que farão de mim uma melhor profissional no futuro e pela confiança depositada durante todo o estágio. Aos meus auxiliares / enfermeiros preferidos (Sofia, Carla, Luís, Pedro e Diogo) porque sem os vossos “raspanetes” eu não teria evoluído.

A todos os meus amiguinhos da turma B que tornaram estes 6 anos muito especiais. Às fofinhas do meu coração, Carol, Clau, Sarita, Martinha, Ju e Rachel pela amizade, bons momentos passado juntas, pelas maluqueiras e risadas partilhadas, pela motivação quando eu desanimava... por durante estes 6 anos terem sido especiais na minha vida e por saber que o continuarão a ser.

Aos animais que passaram pela minha vida, Nala, Kiara, Lady, Hermione, Nicky, Pintas, Pepper e Dior porque foram vocês que me ensinaram o que era o amor incondicional de um animal pelo seu dono, foram vocês que me deram força quando me faltava e foi por vocês que terminei este percurso.

A todos os meus amigos e seus animais que me deixaram realizar os “meus experimentos” e também a todos os proprietários de animais atópicos.

Por último, mas extremamente importante, um obrigado ao amor da minha vida pelos 10 anos de companheirismo, amor incondicional, por estares sempre ao meu lado, por poder partilhar os bons e os maus momentos da minha vida, por me amares tal como eu sou, pela paciência e dedicação e acima de tudo por seres tão especial para mim! Amo-te!

A todos vocês... um enorme OBRIGADO!

## RESUMO

---

### UTILIZAÇÃO DE EXTRACTO DE *STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS* EM TESTES ALERGOLÓGICOS CUTÂNEOS NO CÃO – UM ESTUDO PRELIMINAR

Nos cães com dermatite atópica, as infecções cutâneas recorrentes causadas pelo *Staphylococcus pseudintermedius* são extremamente comuns. Estudos prévios demonstraram que cães atópicos com piodermite recorrente têm títulos mais elevados de imunoglobulina E anti-*Staphylococcus* no soro. Os principais objetivos deste estudo foram definir qual a concentração ideal de extrato de alergénios de *S. pseudintermedius* a utilizar nos testes intradérmicos de cães atópicos e posteriormente determinar a frequência de hipersensibilidade cutânea ao *S. pseudintermedius* em cães atópicos com história de infecção cutânea recorrente. Para isso, realizaram-se testes intradérmicos, onde se testaram diferentes concentrações de extrato de um *S. pseudintermedius* resistente à metilicina (MRSP), estirpe 5819/10. Esta estirpe foi isolada de um cão com piodermite profunda e apresentava os seguintes genes de virulência: *luk-I*, *se-int*, *siet*, *speta*, *ebpS* e *spsL*. As concentrações utilizadas foram 2 µg/ml, 20 µg/ml e 200 µg/ml, assim como um controlo positivo (fosfato de histamina 0.001%) e um controlo negativo (PBS 0.9%). Foram incluídos neste estudo, vinte e três cães saudáveis e vinte e quatro cães atópicos com infecção cutânea recorrente por *S. pseudintermedius*, diagnosticados por citologia cutânea e/ou cultura bacteriana. Dos 23 cães saudáveis presentes neste estudo, 14 (61%) apresentaram reação positiva na concentração de 200 µg/ml. Assim sendo, é bastante provável que a concentração de 200 µg/ml seja irritante e por isso resulte em reações falso-positivas. A concentração de 20 µg/ml foi a concentração mais indicada para ser usada no diagnóstico de hipersensibilidade ao *S. pseudintermedius* em cães atópicos. Posteriormente, foram realizados testes intradérmicos em 24 canídeos atópicos com piodermite e/ou otite bacteriana recorrente com a concentração de 20 µg/ml; quatro destes animais apresentaram reações positivas nesta concentração, o que parecer indicar a existência de reações de hipersensibilidade imediata a componentes do *S. pseudintermedius*. No entanto, limitações que envolviam o extrato impediram a obtenção de resultados reprodutíveis e uniformes. Acreditamos que a imunoterapia específica para esta bactéria pode ser benéfica para o tratamento destes pacientes, o que torna fundamental o diagnóstico de hipersensibilidade ao *S. pseudintermedius*. Nesse sentido, deverão ser realizados mais estudos, de modo a obter um extrato fidedigno que permite alcançar consistência e reprodutibilidade em ambiente clínico e assim melhorar a qualidade dos resultados obtidos nos testes intradérmicos.

**Palavras-chave:** *S. pseudintermedius*, extrato de alergénios, infecção cutânea recorrente, dermatite atópica canina





## ABSTRACT

---

### THE USE OF *STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS* EXTRACT IN SKIN ALLERGY TESTS ON THE DOG – A PRELIMINARY STUDY

In dogs with atopic dermatitis, recurrent skin infections caused by *Staphylococcus pseudintermedius* are extremely common. Previous studies demonstrated that atopic dogs with recurrent pyoderma have higher titers of anti-*Staphylococcus* immunoglobulin E. The main objectives of this study were to define which is the optimal concentration of allergen extract of *S. pseudintermedius* for intradermal tests use in atopic dogs and subsequently determine the frequency of skin hypersensitivity to *S. pseudintermedius* in atopic dogs with a history of recurrent skin infection. For this purpose, intradermal tests were carried out with different concentrations of the extract from a methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP), strain 5819/10. This strain was isolated from a dog with deep pyoderma and presented the following virulence genes: *luk-I*, *se-int*, *siet*, *speta*, *ebpS* and *spsL*. The concentrations used were 2 µg/ml, 20 µg/ml and 200 µg/ml, a positive control (0.001 % histamine phosphate) and a negative control (PBS 0.9 %). Twenty-three healthy dogs and twenty-four atopic dogs with recurrent pyoderma by *S. pseudintermedius*, diagnosed by skin cytology and/or bacterial culture were included in this study. Of the 23 healthy dogs, 14 (61 %) showed a positive reaction in the concentration of 200 µg/ml. Therefore, it is quite likely that the concentration of 200 µg/ml is irritant and so resulted in false-positive reactions. A concentration of 20 µg/ml appeared to be more suitable for use in the diagnosis of *S. pseudintermedius* hypersensitivity in atopic dogs. Subsequently, intradermal tests in 24 atopic dogs with recurrent pyoderma with the concentration of 20 µg/ml were performed. Four of these animals showed a positive reaction in this concentration, which seems to indicate the existence of an immediate hypersensitivity reaction to components of *S. pseudintermedius*. However, limitations involving the extract prevented obtaining reproducible and uniform results. We believe that specific immunotherapy for these bacteria can be beneficial for the treatment of atopic patients, which makes the diagnosis of *S. pseudintermedius* hypersensitivity fundamental. However, more studies should be conducted in order to obtain a reliable extract that can achieve consistency and reproducibility in a clinical environment and thus improve the quality of results obtained in intradermal tests.

**Key words:** *S. pseudintermedius*, allergens extracts, recurrent pyoderma, canine atopic dermatitis



## ÍNDICE GERAL

---

Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract	vi
Índice Geral	viii
Índice de Tabelas	x
Índice de Gráficos	x
Índice de Figuras	xi
Lista de Abreviaturas	xii
<b>I. Relatório do Estágio Curricular</b>	<b>1</b>
<b>II. Dermatite Atópica Canina</b>	<b>4</b>
1. Definição	4
2. Incidência e Prevalência	4
3. Fisiopatologia da Dermatite Atópica Canina	5
3.1 Fatores genéticos	5
3.2 Conhecimentos adquirido no passado	6
3.3 Conhecimento atual	6
3.3.1 O papel dos anticorpos IgE	6
3.3.2 Alterações da barreira cutânea	7
3.3.3 Péptidos Antimicrobianos	9
3.3.4 Inflamação e desregulação do sistema imunitário	10
4. Manifestações Clínicas da Dermatite Atópica	12
4.1 Idade em que surgem os primeiros sinais clínicos	12
4.2 Sazonalidade	12
4.3 Predisposição rática	12
4.4 Predisposição sexual	13
4.5 Sinais Clínicos: distribuição anatômica do prurido, lesões primárias e secundárias	14
4.6 Teoria do Limiar do Prurido	16
5. Infecção cutânea na Dermatite Atópica Canina	16
5.1 Infecção cutânea por estafilococos	16
5.2 Fatores de virulência do <i>S. pseudintermedius</i>	17
5.3 Papel da infecção cutânea por estafilococos na patogênese da DA	19
5.3.1 Adesão e colonização da pele atópica por estafilococos	20
5.3.2 Hipersensibilidade aos estafilococos na DA	21
5.3.3 O papel dos superantígenos na DA	22
5.4 Prevalência e importância dos <i>Staphylococcus</i> spp. meticilina resistentes na infecção cutânea canina	22

5.4.1 Staphylococcus pseudintermedius resistente à meticilina (MRSP)	23
6. Diagnóstico da Dermatite Atópica	24
6.1 Testes alérgicos	25
6.1.1 Testes Intradérmicos	25
6.2 Diagnóstico da infecção cutânea bacteriana secundária	26
6.2.1 Apresentação clínica	26
6.2.2 Citologias cutâneas	26
6.2.3 Testes e culturas bacterianas	27
<b>III. Parte Experimental</b>	30
1. Objetivos	30
2. Determinação prévia da concentração de extrato de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> a utilizar nos testes intradérmicos	30
2.1 Materiais e Métodos	30
2.1.1 Extrato de alérgenos de <i>S. pseudintermedius</i>	30
2.1.2 Seleção dos animais do grupo controlo	31
2.1.3 Citologias Cutâneas	31
2.1.4 Testes Intradérmicos	31
2.2 Resultados	33
2.3 Discussão	36
3. Determinação da prevalência da hipersensibilidade bacteriana em animais atópicos	38
3.1 Materiais e Métodos	38
3.1.1 Seleção dos animais do grupo experimental	38
3.1.2 Citologias cutâneas e/ou auriculares	39
3.1.3 Culturas bacterianas e PCR	40
3.1.4 Testes Intradérmicos	40
3.2 Resultados	40
3.3 Discussão	44
4. Conclusão e Perspetivas Futuras	50
<b>IV. Referências Bibliográficas</b>	51
Anexo I. Termo de Consentimento	60
Anexo II. Ficha de História Clínica	61

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Predisposição rática da DAc.....	13
Tabela 2: Critérios propostos por Favrot e colegas em 2010.....	25
Tabela 3: Critérios para realizar culturas bacterianas e TSA.....	28
Tabela 4: Testes fenotípicos para distinção de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> de outras espécies de estafilococos.....	29
Tabela 5: Critérios de inclusão delineados para o grupo controlo.....	31
Tabela 6: Classificação das re��es imediatas obtidas nos TID utilizando uma escala.....	32
Tabela 7: Resultados obtidos nos TID dos 23 animais incluídos no grupo controlo, após administração das três concentrações do extrato de <i>S. Pseudintermedius</i> .....	36
Tabela 8: Critérios de inclusão delineados para o grupo experimental.....	39
Tabela 9: Resultados obtidos nos TID dos 24 canídeos incluídos no grupo experimental, após administração das três concentrações do extrato de <i>S. pseudintermedius</i> .....	44

##  ndice de Gráficos

Gráfico 1: Distribuição relativa das horas despendidas em cada área do Hospital Escolar da FMV-UL.....	3
Gráfico 2: Representatividade de raças no grupo controlo.....	33
Gráfico 3: Resultados obtidos nas três concentrações de extrato de <i>S. pseudintermedius</i> nos animais do grupo controlo.....	34
Gráfico 4: Representatividade de raças no grupo experimental.....	41
Gráfico 5: Resultados obtidos nas três concentrações de extrato de <i>S. pseudintermedius</i> nos animais do grupo experimental.....	43

## Índice de Figuras

Figura 1: Formação da camada lipídica do EC.....	7
Figura 2: Citocinas que induzem a ativação dos linfócitos Th2 e citocinas produzidas pelos linfócitos Th2 e as suas principais propriedades.....	11
Figura 3: Citocina que induz a ativação dos linfócitos Th1 e citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 e as suas principais propriedades.....	12
Figura 4: Distribuição lesional típica num animal com DAc.....	14
Figura 5: Comissuras labiais de um Dálmata com eritema intenso.....	15
Figura 6: A – Eritema, alopecia e liquenificação no cotovelo de um Grand Danois com dermatite atópica.....	15
Figura 6: B – Zona do mento e comissuras labiais do mesmo animal com eritema, zonas de alopecia autoinduzida e pápulas.....	15
Figura 7: Face côncava do pavilhão auricular de um Pastor Alemão com DA evidenciando eritema intenso.....	15
Figura 8: Esquema simplificado dos fatores de virulência produzidos pelo <i>S. pseudintermedius</i> .....	19
Figura 9: Locais mais comuns de colonização do <i>S. pseudintermedius</i> no cão....	21
Figura 10: Esquema simplificado do procedimento dos TID.....	32
Figura 11: Resultado de um teste alérgico intradérmico, exibindo diversas reações positivas a vários alergénios testados.....	34
Figura 12: <b>A</b> - Resultado de um teste intradérmico ao extrato de <i>S. pseudintermedius</i> , momentos após as administrações.....	35
Figura 12: <b>B</b> – Resultado do mesmo teste intradérmico ao extrato de <i>S. pseudintermedius</i> , cerca de 15 minutos após realizadas as administrações.....	35
Figura 13: <b>A</b> – Aspeto de colónias de <i>Staphylococcus</i> spp. em meio Ágar Sangue.....	42
Figura 13: <b>B</b> – Aspeto de colónias de MRSP em meio Brilliance MRSA2.....	42
Figura 14: Resultado de um teste intradérmico ao extrato de <i>S. pseudintermedius</i> realizado num canídeo do grupo experimental.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

Ac – Anticorpo  
ADN – Ácido desoxirribonucleico  
agr – Gene regulador acessório  
AMPs – Péptidos antimicrobianos  
BD –  $\beta$ -defensina  
Cath – Catelicidina  
CEBEA – Comissão de Ética e Bem Estar Animal  
CWA – *cell-wall anchored*  
DA – Dermatite Atópica  
DAc – Dermatite Atópica canina  
DAPP – Dermatite Alérgica à Picada da Pulga  
EC – Extrato córneo  
ECN – Estafilococos coagulase-negativo  
ECP – Estafilococos coagulase-positivo  
EUA – Estados Unidos da América  
FMV-UL – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa  
GSI – Grupo de *Staphylococcus intermedius*  
IgE – Imunoglobulina E  
IgG – Imunoglobulina G  
IL – Interleucina  
Luk-1 – Leucocidina 1  
MRSP – *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilina  
MSSP – *Staphylococcus pseudintermedius* suscetível à metilina  
*nuc* – gene da termonuclease  
p/v – peso/volume  
PLP2a – Proteína de ligação à penicilina 2a  
PCR – *Polymerase chain reaction*  
PMN – Polimorfonuclear neutrófilo  
PNU/ml – unidades de azoto proteico/mililitro  
SCCmec – Cassete estafilocócico cromossómico mec  
SIET – *Staphylococcus intermedius exfoliative toxin*  
TAC – Tomografia axial computadorizada  
Th1 – Linfócito T *helper* 1  
Th2 – Linfócito T *helper* 2  
TNF -  $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$

TID – Teste intradérmico

TRC – Tempo de repleção capilar

T<sub>REG</sub> – Células T reguladoras

TSA – Teste de suscetibilidade aos antibióticos





## I. RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR

---

O estágio curricular foi realizado no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço e co-orientação da Professora Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba. O estágio teve a duração de 6 meses, no período compreendido entre 27 de Setembro de 2012 e 12 de Abril de 2013. Durante este período foram desenvolvidas diversas atividades na área de clínica de pequenos animais, nomeadamente em Medicina Interna, Imagiologia e Cirurgia em turnos de 8 horas, com horário rotativo semanalmente das 9 às 17 horas ou da 13 às 21 horas. As atividades desenvolvidas no Internamento foram realizadas em turnos de 12 ou 24 horas. No total foram realizadas 1236 horas de estágio (Gráfico 1).

### **Medicina Interna**

Na Medicina Interna foram realizadas 640 horas de serviço. Nesta área, a aluna estagiária teve a oportunidade de desenvolver técnicas de comunicação e de interpretação de informação. Era da competência da estagiária realizar o levantamento da história pregressa do animal, realizar o seu exame físico, e de seguida o caso clínico era analisado em conjunto com o médico veterinário assistente, de modo, a se decidir quais os meios de diagnóstico necessários realizar, assim como o plano de tratamento. Neste serviço, foi possível realizar diversos procedimentos como colheita de sangue, cauterização, administração de fármacos ou vacinas, colocação de microchip, algaliação, realização de pensos, drenagem torácica ou abdominal e diversos testes rápidos de diagnóstico.

Durante o período de estágio, houve inúmeras situações de casos de urgência em que a aluna teve oportunidade de fazer a triagem e interpretar a necessidade de priorização do caso, assim como auxiliar o médico veterinário assistente em todos os procedimentos que eram necessários realizar, incluindo reanimação cardiorrespiratória.

### Dermatologia

Devido ao interesse pela Dermatologia, a estagiária teve a oportunidade de assistir e colaborar nas consultas semanais desta especialidade. Era da competência da estagiária realizar o levantamento detalhado da história clínica do animal dando ênfase à parte dermatológica, realizar exames complementares como tricograma, citologias cutâneas ou auriculares, coloração e visualização de lâminas ao microscópio, colheita de material para cultura bacteriana, biopsias de pele, realização de testes intradérmicos e imunoterapia (protocolo *rush* e convencional). Todos os casos clínicos foram analisados em conjunto com a Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço e foi decidido qual o plano terapêutico e, sempre que possível foi realizado um relatório clínico. A estagiária tinha ainda a função de

acompanhar estes casos durante o tratamento, entrando em contacto com o proprietário do animal sempre que necessário.

### Oncologia

A aluna teve também a oportunidade de assistir e colaborar em diversas consultas de oncologia. As sessões de quimioterapia eram realizadas duas vezes por semana, competia à estagiária receber o animal, pesá-lo, colocar cateter e realizar a colheita de sangue para análise hematológica. Após recebido o resultado do hemograma, o médico veterinário assistente preparava os quimioterápicos em local apropriado e de seguida estes eram administrados.

### **Imagiologia**

Na imagiologia foram realizadas 104 horas de trabalho, divididas pelas seguintes áreas: radiologia, ecografia e tomografia axial computadorizada (TAC).

Na radiologia, as funções desempenhadas foram contenção e posicionamento do animal, revelação da cassete e interpretação da imagem radiológica juntamente com o clínico responsável. Sempre que necessário sedar um animal, competia à estagiária controlar a anestesia e vigiar os sinais vitais do animal. Na ecografia, procedeu-se à contenção dos animais e auxílio na realização de procedimentos ecoguiados. Na TAC, a estagiária colaborou na contenção dos pacientes, na sua cateterização, na indução e controlo da anestesia, assim como na monitorização dos sinais vitais do paciente.

### **Internamento**

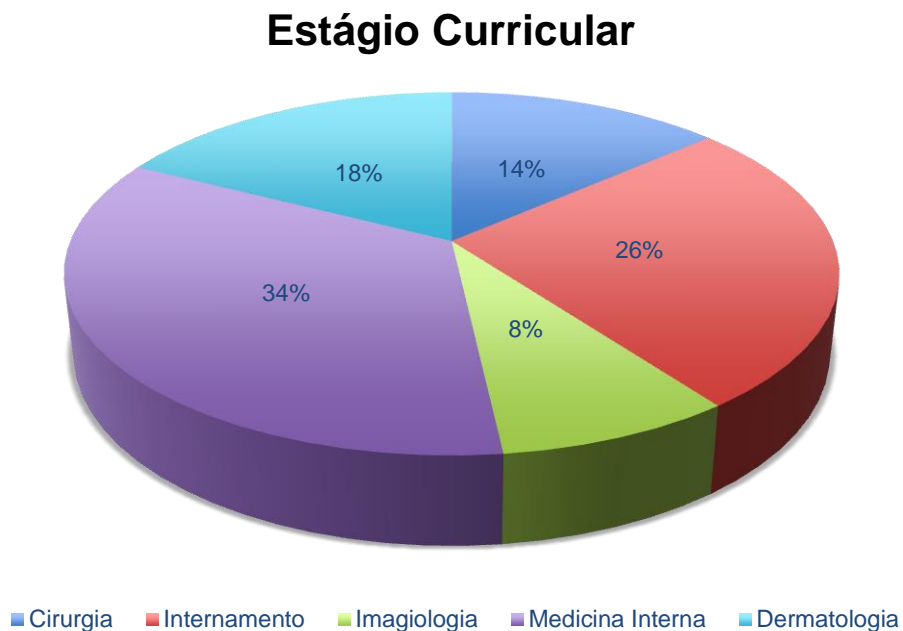
No internamento foram efetuadas 324 horas de trabalho. Neste serviço, a estagiária era responsável: pela realização de todos os tratamentos indicados para o animal, de acordo com a sua ficha de internamento; bem como da sua alimentação; higienização das jaulas; monitorização do paciente (frequência cardíaca e respiratória, pulso, cor das mucosas, tempo de repleção capilar e temperatura) e no caso dos cães de os levar a passear ou no caso dos gatos de limpar a areia. Quando necessária, a aluna estagiária realizava ainda diversos procedimentos tais como colheita de sangue, cateterização, enemas, fisioterapia, curvas de glicémia, medição da pressão arterial, algaliação, colheita de urina, entre outros, sempre com a supervisão do médico veterinário assistente.

### **Cirurgia**

A aluna estagiária passou cerca de 168 horas na cirurgia. Nesta área, a aluna acompanhava o paciente desde a sua admissão no hospital até ao internamento, onde se realizava o pós-operatório. Neste serviço, a estagiária pode ocupar três funções distintas: a de circulante - auxiliava a preparação do cirurgião e do ajudante do cirurgião e fornecia o material

necessário para a cirurgia; a de anestesista – realizava a indução e o controlo da anestesia, com monitorização periódica do animal (de 5 em 5 minutos) e a de ajudante do cirurgião.

Gráfico 1: Distribuição relativa das horas despendidas em cada área do Hospital Escolar da FMV-UL.



## II. DERMATITE ATÓPICA CANINA

---

### 1. Definição

A dermatite atópica canina (DAc) é definida como uma doença cutânea inflamatória e pruriginosa com predisposição genética. As suas características clínicas estão principalmente associadas ao efeito provocado por imunoglobulinas E (IgE), na sua maioria, direcionadas contra alérgenos ambientais (Halliwell, 2006). A patogénese desta doença é complexa e multifatorial, incluindo fatores como desregulação do sistema imunológico, sensibilização alérgica, defeitos na barreira cutânea, colonização microbiana e fatores ambientais (Nuttal, Uri, & Halliwell, 2013). Scott et al. (2001) consideram a DAc a segunda causa mais comum de prurido canino, depois da dermatite alérgica à picada da pulga (DAPP).

### 2. Incidência e Prevalência

Desde a 2ª Guerra Mundial, que se verifica um aumento da prevalência das doenças atópicas nos humanos, especialmente em países desenvolvidos (Boguniewicz & Leung, 1998; Okudaira, 1998). Apesar de haver uma predisposição genética para o desenvolvimento destas doenças, suspeita-se que o rápido aumento da prevalência esteja mais relacionado com fatores ambientais do que com fatores genéticos (Okudaira, 1998). Os fatores ambientais que parecem estar intimamente associados com o aumento desta incidência são: aumento da carga de alérgenos de interior, aumento da exposição a poluentes nocivos, diminuição dos agregados familiares, diminuição da carga microbiana, exposição à infeção numa idade jovem, um ambiente cada vez mais urbanizado e mudanças de hábitos alimentares (Boguniewicz & Leung, 1998). Além disso, a utilização cada vez mais frequente de tratamentos profiláticos de desparasitação parecem também estar relacionados com o aumento da incidência, uma vez que existem dados que sugerem que as infeções parasitárias podem ter um papel protetor no desenvolvimento das alergias (Hagel et al., 1993). A maioria destes fatores estão também presentes no ambiente dos cães, parecendo provável que um aumento similar da incidência desta doença esteja a ocorrer na espécie canina. Outros fatores que podem também contribuir para um aumento da incidência da DAc são a existência de planos de vacinação mais completos para cachorros o que pode aumentar a produção de anticorpos (Ac) IgE, maior controlo de doenças parasitárias através da desparasitação externa e interna e essencialmente uma maior exposição a ácaros domésticos em ambientes de interior (Hillier & Griffin, 2001). Recentemente, a prevalência da dermatite atópica (DA) na população canina em geral foi estimada em cerca de 10% (Scott, Miller, & Griffin, 2001). No entanto, esta estimativa não foi

baseada em dados epidemiológicos fiáveis e, portanto, a verdadeira incidência e prevalência da DAc permanece desconhecida (Hillier & Griffin, 2001).

### **3. Fisiopatologia da Dermatite Atópica Canina**

O que sabemos sobre a fisiopatologia da doença cutânea em cães frequentemente denominada de dermatite atópica sofreu imensas alterações durante os últimos 75 anos. Em 1933, Schnelle denominou esta doença canina de eczema, mais tarde devido à via de exposição aos alérgenos que se acreditava ser de maior importância, esta doença passou a ter a designação de dermatite alérgica inalatória canina e só mais tarde foi referida como atopia canina. Atualmente, a doença cutânea associada a atopia nos cães é mundialmente conhecida como DAc (Marsella, Sousa, Gonzales, & Fadok, 2012). Como já foi referido a sua patogénese é multifatorial, portanto o que se pretende neste capítulo é abordar sucintamente vários fatores determinantes no mecanismo fisiopatológico da doença.

Desde a primeira descrição desta doença, grandes avanços foram feitos em medicina humana, particularmente no que diz respeito ao que se sabe sobre a forma como o sistema imunitário funciona. Muito do conhecimento adquirido sobre as alergias nos seres humanos pode ser aplicado em pacientes veterinários, com a ressalva de que os cães não são humanos. Embora existam diferenças entre as espécies em alguns aspetos do sistema imunitário, a função imunitária dos mamíferos é bastante consistente e alguns dos princípios compreendidos em medicina humana podem ser aplicados a pacientes veterinários (Marsella et al., 2012). Além disso, as semelhanças na fisiologia da doença, na apresentação clínica, na resposta ao tratamento e o facto de o cão partilhar o mesmo ambiente que as pessoas torna este animal um modelo adequado ao estudo da DA humana (Lourenço, Peleteiro, Correia, & Morais-Almeida, 2010).

#### **3.1 Fatores genéticos**

Na tentativa de esclarecer qual o mecanismo genético associada à DAc, muitos investigadores focaram-se na hereditariedade do gene responsável pela produção de IgE (Sousa & Marsella, 2001). Foi proposto que a capacidade de produzir níveis elevados de IgE é geneticamente herdada de forma dominante (de Weck, 1995). O potencial do gene em produzir altas quantidades de IgE parece só ocorrer sob certas condições, tais como exposição a alérgenos desde o início da vida do animal e repetidamente. Estes autores enfatizam assim, a importância dos fatores ambientais e genéticos na produção deste Ac. No entanto, a concentração sérica de IgE em cachorros que posteriormente desenvolvem DA não é significativamente diferente da concentração apresentada por cachorros que permanecem saudáveis. Concluiu-se que a produção deste Ac não pode ser utilizada como um indicador para prever o desenvolvimento da dermatite atópica no cão. São necessários

mais estudos para um melhor entendimento da genética desta doença na população canina (Sousa & Marsella, 2001)

### **3.2 Conhecimento adquirido no passado**

No início do estudo da doença atópica canina acreditava-se que a exposição aos alérgenos ambientais ocorria por inalação dos mesmos, com desenvolvimento de sinais clínicos que envolviam o trato respiratório superior (Patterson, 1959; Wittich, 1941). Após a exposição e reexposição a aeroalérgenos, os animais produziam anticorpos específicos para o alérgeno e desenvolviam sinais clínicos como: conjuntivite atópica, rinite, asma e até anafilaxia. A sensibilidade cutânea poderia ser confirmada por testes intradérmicos positivos, mas nenhum dos animais que integravam estes estudos apresentavam os sinais clínicos característicos da DAc (Patterson, Pruzansky, & Chang, 1963; Patterson & Sparks, 1962). A partir destas descrições iniciais foi estabelecido um mecanismo fisiopatológico simples para a atopia canina (reações de hipersensibilidade do tipo I), que serviu de dogma durante vários anos (Marsella et al., 2012). Os cães sensibilizados por alérgenos ambientais por via respiratória ou por absorção percutânea, produziam anticorpos IgE alérgeno-específica. Seguidamente, estes anticorpos ligavam-se aos mastócitos e basófilos da derme. Uma reexposição aos alérgenos envolvidos neste mecanismo resultava numa desgranulação dos mastócitos e basófilos e, conseqüentemente, numa libertação de histamina, serotonina e fator quimiotático dos eosinófilos (Marsella et al., 2012). O eritema e prurido apresentado pelos cães atópicos era causado por estas citocinas inflamatórias (Marsella et al., 2012). Em 1965, Schwartzman agrupou todos os cães com sinais de doença respiratória alérgica e doença cutânea prurítica sob o diagnóstico de atopia, considerando que se existia uma componente respiratória esta se tratava de um achado acidental (Schwartzman, 1965). A exposição aos alérgenos por via inalatória pode contribuir para o aparecimento de DAc em cães, no entanto não se trata da principal via de exposição aos alérgenos (Marsella, Nicklin, & Lopez, 2006).

### **3.3 Conhecimento atual**

#### **3.3.1 O papel dos anticorpos IgE**

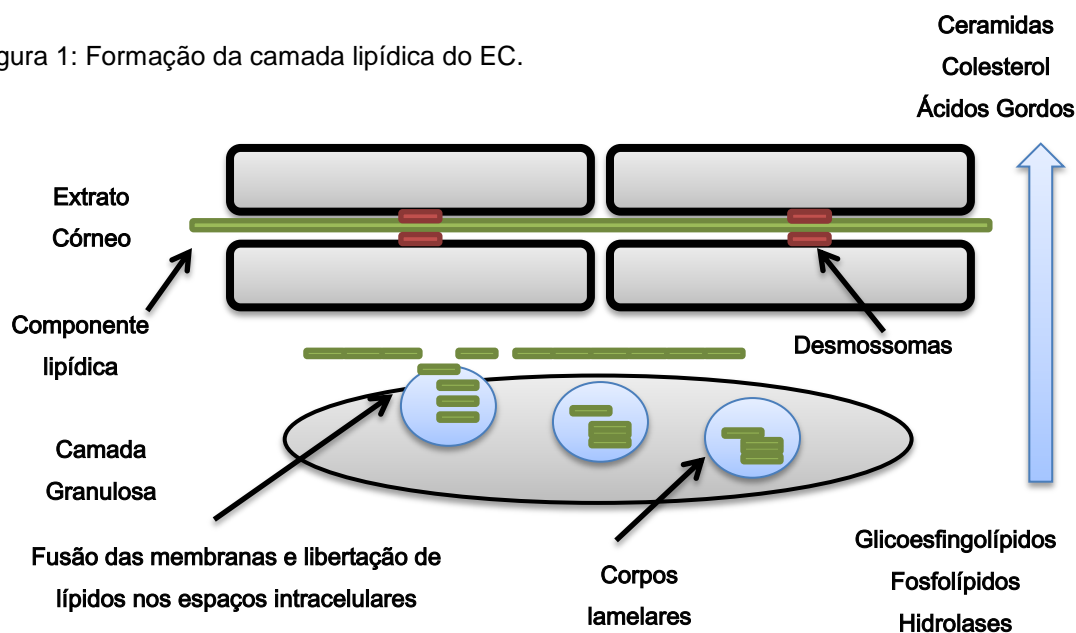
As pesquisas efetuadas inicialmente davam ênfase à resposta humoral (maioritariamente por IgE) desenvolvida após exposição aos alérgenos. Depois da descoberta da IgE canina, foi possível através de testes intradérmicos e testes *in vitro* demonstrar a presença de IgE alérgeno-específico em cães com DAc. Apesar da IgE ter um importante papel na patogénese da DAc, no aumento da eficiência da captura de alérgenos e também na participação da resposta inflamatória que daí se desenvolve, este anticorpo não consegue explicar por si só todos os aspetos desta doença complexa (Marsella et al., 2012). Os

opponentes deste mecanismo patogénico focam o facto de cães saudáveis que não desenvolvem a doença apresentarem testes intradérmicos positivos quando testados com alérgenos ambientais e a presença de IgE alérgeno-específica no soro (DeBoer & Hill, 1999; DeBoer & Hillier, 2001). Portanto, parece provável que o desenvolvimento desta doença esteja dependente de outros fatores tais como diferenciação de células T em subpopulações e alterações na barreira cutânea (Marsella et al., 2012).

### 3.3.2 Alterações da barreira cutânea

Devido à sua grande área de superfície, a pele (mais especificamente a epiderme) está em contacto constante com poluentes ambientais, substâncias irritantes e alérgenos (Mauldin, 2006). O extrato córneo (EC) é a camada mais superficial da epiderme que serve de barreira protetora entre o organismo e o meio ambiente. Esta camada epidérmica é responsável pela hidratação da pele, restringindo os movimentos de entrada e saída de água por via cutânea. Além disso, o EC previne o acesso de agentes patogénicos ao organismo, devido à sua descamação contínua que permite a expulsão dos mesmos (Mauldin, 2006). A componente lipídica deste extrato constituída por ceramidas, colesterol e ácidos gordos atua como uma espécie de cola, sendo responsável pela adesão dos queratinócitos entre si, e tem também a função de impedir a perda de água e limitar a penetração de substâncias exógenas, como os alérgenos (Marsella & Samuelson, 2009) (Figura 1). O EC possui ainda péptidos antimicrobianos naturais que eliminam os microrganismos através de diversos mecanismos (Mauldin, 2006).

Figura 1: Formação da camada lipídica do EC.



Legenda: Durante o processo de queratinização, os corpos lamelares existentes no extrato granuloso são indispensáveis na aquisição de lipídios e enzimas essenciais para a formação de uma barreira lipídica extracelular. Na transição entre a camada granulosa e o extrato córneo da epiderme ocorre a



fusão dos corpos lamelares com as membranas dos queratinócitos e a libertação do seu conteúdo nos espaços intercelulares. Após esta libertação, várias enzimas modificam os lípidos libertados, iniciando-se a formação de um selo hidrofóbico para auxiliar na impermeabilização da epiderme (adaptado de Mauldin, 2006).

Demonstrou-se que a presença de uma barreira cutânea comprometida pode ser responsável pelo aumento da penetração de alérgenos e consequentemente do aumento de risco de sensibilização em pessoas (Cork et al., 2009). Uma vez que a inflamação é desencadeada, mais deteriorações na barreira podem ocorrer, levando a ciclos de auto perpetuação de sensibilização. A DAC parece possuir diversas semelhanças com a dermatite atópica humana, tanto do ponto de vista clínico como imunológico (Marsella & Samuelson, 2009). A combinação de uma barreira cutânea comprometida e a repetida exposição a alérgenos leva ao desenvolvimento de uma resposta de IgE contra os alérgenos. A partir deste facto, rapidamente se chegou à evidência que as alterações da barreira cutânea também estavam envolvidas na patogénese da DAC (Marsella et al., 2012). Após um estudo preliminar que documentou as irregularidades estruturais nas camadas superiores da epiderme de cães atópicos (Inman, Olivry, Dunston, Monteiro-Riviere, & Gatto, 2001), mais estudos foram realizados que documentaram não só estas alterações estruturais como também alterações funcionais na barreira cutânea de cães com DAC (Marsella, Samuelson, & Harrington, 2009; Shimada, Yoon, Yoshihara, Iwasaki, & Nishifuji, 2009). Ambas as alterações foram medidas pelo aumento de perda de água transepidérmica (Inman et al., 2001; Shimada et al., 2009). Mais especificamente, as alterações ultra-estruturais do EC estão geralmente presentes na pele sem lesões de animais atópicos e são agravadas após a exposição aos alérgenos e após o desenvolvimento de lesões cutâneas (Marsella, Samuelson, & Doerr, 2010). Estas alterações incluem alargamento dos espaços intercelulares, retenção de corpos lamelares (organelos dos lípidos) nos queratinócitos e irregularidades e fragmentação da camada lipídica (Marsella et al., 2012). Estas alterações são muito semelhantes às encontradas em seres humanos com DA, em que a pele anormalmente seca (xerose) supõe-se ser devido a um defeito de extrusão de corpos lamelares e a sua retenção dentro dos queratinócitos, resultando em alterações da composição química da barreira lipídica da epiderme e um aumento da perda de água transepidérmica (Fartasch, Bassukas, & Diepgen, 1992; Werner, Lindberg, & Forslind, 1987). Nos seres humanos, estas alterações ultra-estruturais são ainda acompanhadas por uma diminuição das ceramidas epidérmicas e este decréscimo deve-se ao aumento da sua degradação devido a múltiplas alterações enzimáticas (Imokawa, 2009; Macheleidt, Kaiser, & Sandhoff, 2002). Estudos realizados na espécie canina indicam que cães atópicos também apresentam diminuição das ceramidas, mas até ao momento desconhece-se se esta diminuição ocorre devido a alterações enzimáticas, perturbação da extrusão de organelos ou ambas (Reiter, Torres, & Wertz, 2009; Shimada et al., 2009). Alterações na

proteína filagrina parecem também contribuir para o comprometimento da barreira cutânea na DA. A filagrina é uma proteína produzida pelas células cutâneas, que se degrada em aminoácidos durante a maturação dos queratinócitos e que é essencial para a manutenção da hidratação nas camadas exteriores da pele intacta (Marsella et al., 2012). Nos seres humanos atópicos, várias mutações no gene que codifica a filagrina com perda de função foram identificadas e são consideradas um importante fator predisponente para a DA (Palmer et al., 2006; Sandilands, Sutherland, Irvine, & McLean, 2009). A consequência de uma mutação no gene da filagrina com perda de função é a formação de uma pele seca e escamosa, que é mais permeável aos alérgenos, agentes patogénicos e irritantes químicos (Marsella et al., 2012). Um estudo recente em medicina veterinária também demonstrou haver alterações na expressão desta proteína em cães com DAC, assim como mutações no gene de filagrina com perda de função (Chervet et al., 2010).

Até ao momento, desconhece-se se as alterações observadas na barreira cutânea na DA são devidas a um defeito primário ou se são secundárias à inflamação que se desenvolve após a exposição aos alérgenos (Marsella et al., 2012).

### **3.3.3 Péptidos Antimicrobianos**

Os péptidos antimicrobianos (AMPs) são pequenas proteínas que possuem diversas funções, entre as quais se incluem atividade antimicrobiana contra um largo espectro de microrganismos, estão envolvidos na cicatrização de feridas e possuem ainda a capacidade de desencadear e modular a resposta imunitária inata e adquirida (Santoro, Bunick, Graves, & Segre, 2013). Clinicamente, a importância dos AMPs como antimicrobianos naturais da pele é evidenciada pela sua expressão aumentada na pele infetada, levando à resolução da piodermite (Santoro, Bunick, Graves, & Campbell, 2010). Nos animais, os AMPs estão localizados nos tecidos que frequentemente estão em contacto com os agentes patogénicos externos, como as mucosas e a pele (Jenssen, Hamil, & Hancock, 2006). Vários AMPs foram identificados em diversas espécies (incluindo o cão), mas os mais abundantemente estudados são a  $\beta$ -defensina (BD) e a catelicidina (Cath) (Schauber & Gallo, 2008). Estas moléculas são secretadas principalmente pelos queratinócitos, glândulas sebáceas e mastócitos. No entanto, os neutrófilos podem também contribuir para a sua produção (Santoro et al., 2010).

Um aumento da expressão de AMPs em algumas doenças inflamatórias humanas, tais como a DA e a psoríase, demonstrou o envolvimento destes péptidos em doenças inflamatórias cutâneas (Santoro et al., 2013). Diferenças na expressão de BD nestas duas doenças – mais baixa na DA e mais alta na psoríase – deve-se provavelmente a diferentes padrões imunológicos que caracterizam estas doenças inflamatórias (Santoro et al., 2010). Estudos realizados recentemente têm sugerido que a expressão diferencial de AMPs podem

estar na origem de uma maior suscetibilidade a infecções bacterianas em indivíduos atópicos quando comparados com pacientes com psoríase (Santoro et al., 2010).

Poucos estudos têm sido desenvolvidos sobre a possibilidade de envolvimento dos AMPs na patogênese da DAc (Santoro et al., 2013). Tal como os seres humanos com DA, os cães atópicos são mais suscetíveis às infecções cutâneas bacterianas e/ou por leveduras do que os animais saudáveis, mas só recentemente houve um interesse crescente no papel dos AMPs na sua predisposição (Schauber & Gallo, 2008). Tem-se colocado a hipótese de este aumento de suscetibilidade estar associado a uma diminuição da produção de AMPs ou na produção de AMPs não funcionais (Fazakerley, Crossley, McEwan, Carter, & Nuttal, 2010; Santoro et al., 2010; Santoro et al., 2013). A atividade das BD tem sido investigada em alguns estudos, mas os resultados obtidos não têm sido consistentes (Santoro et al., 2013). O papel dos AMPs na DAc permanece por esclarecer e por isso é necessário mais estudos (Nuttal et al., 2013).

### **3.3.4 Inflamação e desregulação do sistema imunitário**

As células Langerhans que estão presentes na epiderme e na derme funcionam como células apresentadoras de antígenos, apresentando o antígeno aos linfócitos T. Após a sensibilização inicial ao alérgeno, estas células dendríticas ligam-se a IgE alérgeno-específica e promovem o desenvolvimento de uma resposta imunitária eficiente contra o antígeno, através da ativação de linfócitos T *helper* 2 (Th2) (Marsella et al., 2012). Recentemente um estudo em medicina humana demonstrou que células dendríticas da derme produzem interleucina 25 (IL-25) (Schauber & Gallo, 2008). Esta interleucina induz a produção de citocinas associadas a linfócitos Th2 e reduz a produção de filagrina pelos queratinócitos. Altas concentrações de IL-25 foram detetadas na pele de humanos que sofrem de DA (Fort et al., 2001; Hvid et al., 2011). Estes estudos sugerem que as células dendríticas podem ter um contributo adicional na patogênese da DA. Além do seu papel de apresentadoras de antígeno, estas células podem ser também fundamentais na indução de resposta pelos linfócitos Th2 na pele e contribuir para a alteração da barreira cutânea (Ebner et al., 2007; Hvid et al., 2011).

Os macrófagos são o tipo de células mais comuns nos infiltrados celulares das lesões crónicas de DA nos seres humanos (Leung, 1995) e são também frequentemente observados em biópsias de pele de cães com DAc (Wilkie, Yager, Eyre, & Parker, 1990). Estas células desempenham um papel fundamental na iniciação, propagação e resolução da inflamação e possuem grande capacidade de produzir mediadores pró-inflamatórios como a interleucina 1 (IL-1), a interleucina 18 (IL-18), a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), assim como de produzir citocinas que auxiliam na resolução da inflamação (Marsella, Olivry, & Carlotti, 2011).

Os linfócitos T *helper* têm um papel fundamental na patogênese da DAc e a sua diferenciação em subpopulações caracteriza diferentes estágios da doença (Marsella et al., 2012). As citocinas produzidas pelos linfócitos Th2 são predominantes na fase aguda da DA, ou seja, 12 a 24 horas após a exposição ao antígeno (Marsella et al., 2012). Estas citocinas e principalmente a interleucina 4 (IL-4) estimulam a proliferação de células B e a secreção de imunoglobulinas, nomeadamente a IgE (Marsella et al., 2012; Tizard, 2009) (Figura 2). As citocinas produzidas pelos linfócitos T *helper* 1 (Th1) são preponderantes na fase crónica da dermatite atópica, 48 a 96 horas após a exposição ao antígeno, promovendo a resposta imunitária celular como as reações de hipersensibilidade retardada e a ativação de macrófagos (Marsella et al., 2012; Tizard, 2009) (Figura 3). Estas citocinas produzidas pelos linfócitos T podem causar alterações deletérias na pele, nomeadamente na diminuição da expressão de proteínas da barreira, diminuição da produção de produtos antimicrobianos e fatores de adesão, assim como diminuição da viabilidade dos queratinócitos e aumento da suscetibilidade a infeções cutâneas (Marsella et al., 2012; Ong & Leung, 2006). As respostas anómalas das células T reguladoras (T<sub>REG</sub>) parecem também estar envolvidas na patogênese da DA. As T<sub>REG</sub> são uma população de células T especializadas que mantêm a homeostasia da reposta imunitária ou a tolerância periférica (Bettini & Vignali, 2009) e foi demonstrado que suprimem a ativação de células T específicas para o alérgénio (Verhagen et al., 2006).

Figura 2: Citocinas que induzem a ativação dos linfócitos Th2 e citocinas produzidas pelos linfócitos Th2 e as suas principais propriedades.

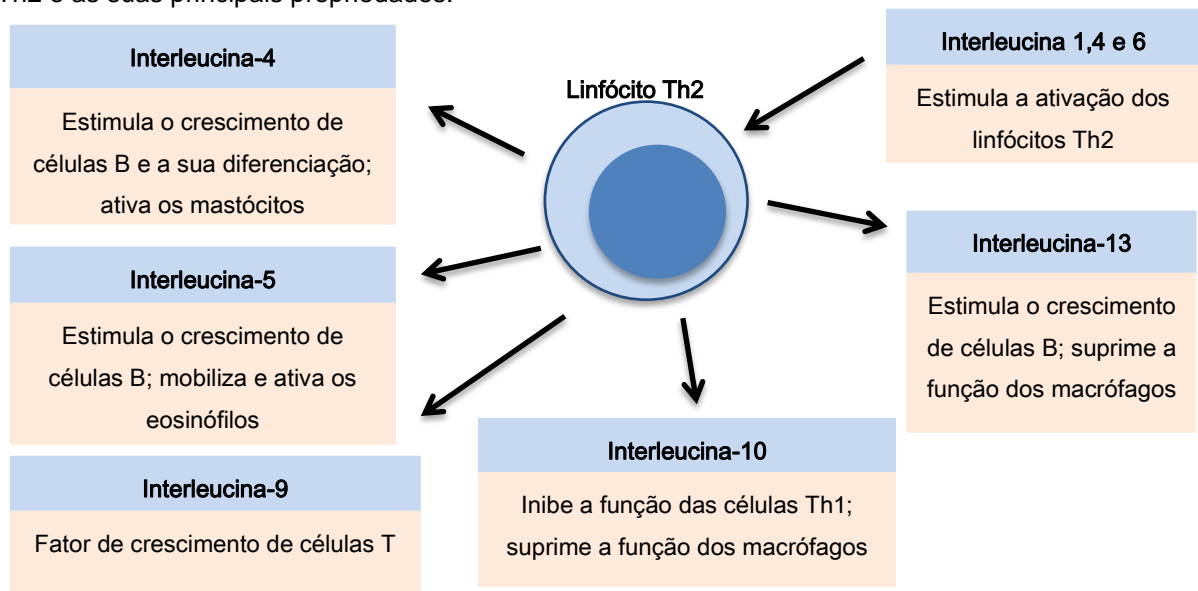
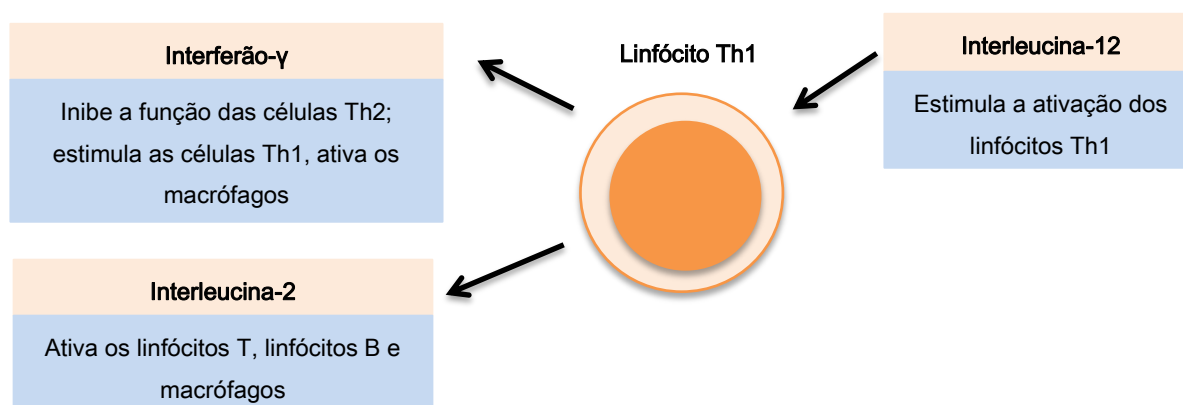


Figura 3: Citocina que induz a ativação dos linfócitos Th1 e citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 e as suas principais propriedades.



## 4. Manifestações Clínicas da Dermatite Atópica

### 4.1 Idade em que surgem os primeiros sinais clínicos

Os primeiros sinais clínicos da DAC surgem, normalmente, entre os 6 meses e os 3 anos de idade. Apesar de ser raro os primeiros sintomas aparecerem em animais com menos de 6 meses e em animais com idade superior a 7 anos, isto é possível acontecer (Griffin & DeBoer, 2001).

### 4.2 Sazonalidade

No início da DAC, os sinais clínicos podem ou não apresentar sazonalidade, dependendo dos alérgenos envolvidos (Griffin & DeBoer, 2001). Em 42-75% dos cães com DA a sintomatologia inicial é sazonal, sendo que 80% dos animais com doença sazonal são sintomáticos da Primavera ao Outono e os restantes 20% no Inverno (Scott, 1981). Com a progressão da doença a maioria dos animais, provavelmente, exibirá sintomatologia permanente (não sazonal) (Griffin & DeBoer, 2001).

### 4.3 Predisposição racial

Muitos autores consideram que a DAC possui uma componente genética devido a esta doença aparecer com maior frequência em determinadas raças (Sousa & Marsella, 2001). Diversos estudos anteriormente realizados sobre a predisposição racial da DAC não fazem referência à população base local, o que poderá ter levado a resultados adulterados nas raças localmente populares. É fundamental ter em consideração que a predisposição racial observada na DAC sofre variações tanto regionais, como temporais (Tabela 1) (Griffin & DeBoer, 2001). Mesmo assim com base nestes estudos, realizados em diversos períodos de tempo e diferentes localizações geográficas, concluiu-se quais as raças com maior risco

para desenvolverem DAC: Beauceron, Boston Terrier, Boxer, Cairn Terrier, Shar Pei, Cocker Spaniel, Dálmata, Bulldog Inglês, Setter Inglês, Fox Terrier, Setter Irlandês, Retriever do Labrador, Labrit, Lhasa Apso, Schnauzer Miniatura, Pug, Scottish Terrier, Salyham Terrier, Setter, West Highland White Terrier, Wire Haired Fox Terrier e Yorkshire Terrier. As raças com menor risco relativo são as seguintes: Cocker Spaniel, Baixote, Doberman Pinscher, Pastor Alemão, Braco Alemão e todos os tipos de Caniche (Griffin & DeBoer, 2001).

Tabela 1: Predisposição rática da DAC (adaptado de: Sousa & Marsella, 2001)

Ano	País	Raças
1980s	EUA	Boston Terrier, Cairn Terrier, Dalmatian, Bulldog Inglês, Setter Inglês, Golden Retriever, Setter Irlandês, Retriever do Labrador, Lhasa Apso, Schnauzer Miniatura, Pug, Scottish Terrier, West Highland White Terrier, Wirehaired Fox Terrier
1980s	Europa	Boxer, Pastor Alemão, Caniche
1992	Suécia	Boxer, Cairn Terrier, Fox Terrier, Pastor Alemão, Golden Retriever, Retriever do Labrador, West Highland White Terrier
1993	Wisconsin e norte de Illinois, nos EUA	American Cocker Spaniel, Retriever do Labrador, Indeterminadas
1994	Alemanha	Boxer, Bull Terrier, Chow Chow, West Highland White Terrier
1994	Sudoeste da França	Fox Terrier, Pastor dos Pirineus, Tervueren Shepherd Dogs, Retrievers do Labrador
1995	Reino Unido	Boxer, Retriever do Labrador, West Highland White Terrier
1996	Holanda	Pastor Alemão, Golden Retriever, Retriever do Labrador, West Highland White Terrier
1998	Grécia	Boxer, Chihuahua, Gordon Setter, Yorkshire Terrier
2007	Suíça (Picco et al., 2008)	West Highland White Terrier, Boxer, Bouledog Francês, Bull Terrier

#### 4.4 Predisposição de género

Os resultados obtidos em estudos sobre a predisposição de género da dermatite atópica nos cães são inconsistentes (Griffin & DeBoer, 2001). Nesbit (1978) refere uma maior suscetibilidade para o desenvolvimento da DAC nos machos, noutros estudos esta predisposição foi atribuída às fêmeas (Halliwell & Schwartzman, 1971; Nesbitt, Kedan, & Caciolo, 1984; Scott, 1981) e, existem ainda estudos que concluíram não haver uma predisposição sexual na DAC (Carlotti & Costargent, 1994; Saridomichelakis, Koutinas, Gioulekas, & Leontidis, 1999; Willemse & van den Brom, 1983). No entanto, um estudo realizado recentemente verificou que os machos apresentam uma predisposição para a DAC semelhante às fêmeas. Contudo, fêmeas inteiras parecem ser mais predispostas a apresentar DAC do que fêmeas ovariectomizadas (Lourenço, 2010).

#### 4.5 Sinais Clínicos: distribuição anatômica do prurido, lesões primárias e secundárias

O prurido é, normalmente, o primeiro sinal clínico a ser observado em cães com DAc, podendo estar presente sem haver mais nenhuma alteração cutânea (Marsella & Olivry, 2003). Geralmente, um animal com DAc exibe prurido na face, orelhas, axilas, extremidade dos membros e abdômen (Favrot, Steffan, Seewald, & Picco, 2010). Existem diversas opiniões sobre a natureza das lesões primárias que podem ser observadas na DAc. No entanto, é unânime que alguns cães com DA não apresentam lesões primárias visíveis mesmo em zonas pruriginosas, e quando presentes, estas consistem essencialmente em eritema (Griffin & DeBoer, 2001) (Figura 5). As lesões clínicas afetam principalmente zonas ventrais que apresentam pouca pilosidade como as axilas, a região inguinal e áreas interdigitais. As lesões localizadas nas zonas flexoras e de fricção são áreas que possivelmente sofrem uma abrasão crónica, o que facilita a fricção de alérgenos com a epiderme (Marsella & Olivry, 2003) (Figura 4). As lesões secundárias estão frequentemente associadas à DAc e refletem o prurido crónico, traumatismo, inflamação crónica e infeções secundárias recorrentes. As lesões secundárias reportadas com maior regularidade são manchas acrais vermelho-acastanhadas na pelagem, escoriações, alopecia autoinduzida, pêlo seco e sem brilho, hiperpigmentação, crostas e liquenificação, sendo observadas principalmente nas zonas pruriginosas (Figura 6A e 6B) (Griffin & DeBoer, 2001; Marsella & Olivry, 2003). A otite externa é também uma manifestação comum na DAc (Figura 7), assim como as infeções secundárias bacterianas ou por leveduras (Griffin & DeBoer, 2001) e a conjuntivite que geralmente é subdiagnosticada nestes pacientes (Lourenço, Delgado, et al., 2010).

Figura 4: Distribuição lesional típica num animal com DAc (adaptado de Lourenço Martins, 2010). (Imagem gentilmente cedida por Pedro Canilho).





Figura 5: Comissuras labiais de um Dálmata com eritema intenso (Fotografias originais da autora).



Figura 6: **A** – Eritema, alopecia e liquenificação no cotovelo de um Dogue Alemão com dermatite atópica. **B** – Zona do mento e comissuras labiais do mesmo animal com eritema, zonas de alopecia autoinduzida e pápulas (Fotografias originais da autora).

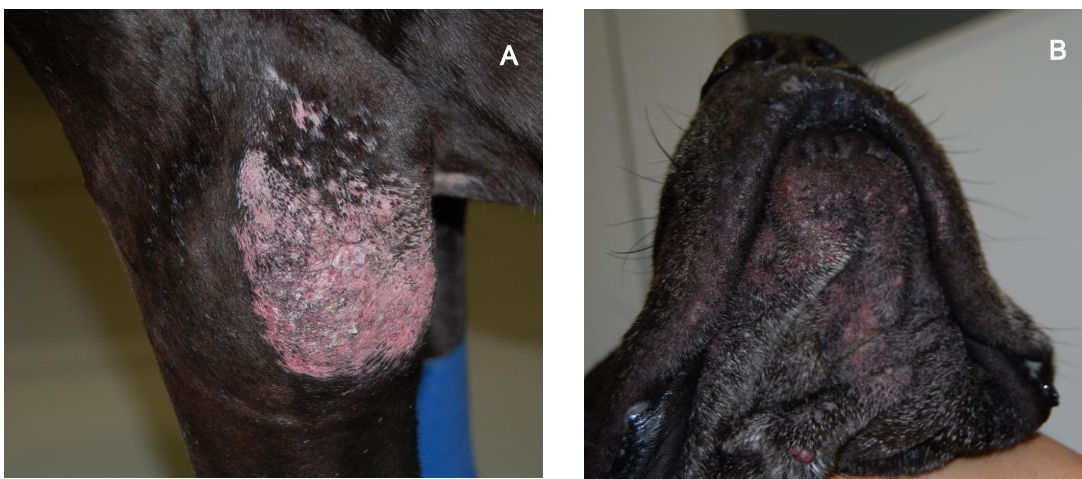
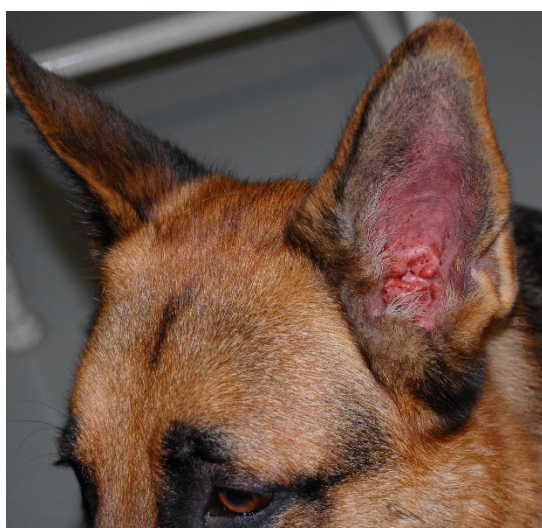


Figura 7: Face côncava do pavilhão auricular de um Pastor Alemão com DA evidenciando eritema intenso (Fotografia original da autora).





#### 4.6 Teoria do Limiar do Prurido

A teoria do limiar do prurido pressupõe que cada indivíduo é capaz de tolerar alguns estímulos pruriginosos sem apresentar sintomatologia clínica (Marsella & Sousa, 2001). Pelo contrário, quando múltiplos estímulos estão presentes ao mesmo tempo e é ultrapassado o limiar do prurido o paciente torna-se sintomático, ou seja, exhibe prurido. O conceito de limiar do prurido relaciona-se com a presença de diversos estímulos que podem contribuir para o nível de prurido do paciente (Marsella & Sousa, 2001). Assim sendo, o limiar para o desenvolvimento da DAc relaciona-se com a quantidade de alérgenos presentes no meio ambiente do animal. Esta teoria tem importantes implicações no tratamento de cães com DAc, uma vez que a eliminação de pulgas e/ou o controlo de reações de hipersensibilidade alimentar podem permitir que o animal tolere a presença de outros aeroalérgenos sem se tornar sintomático (Marsella & Sousa, 2001).

A colonização cutânea por bactérias ou por leveduras contribui para o desenvolvimento da resposta inflamatória e a libertação de mediadores pruriginosos (Marsella & Sousa, 2001). Adicionalmente, estes microrganismos podem ser considerados alérgenos o que resulta na produção de IgE. Assim sendo, o controlo de infeções secundárias bacterianas e/ou por *Malassezia* pode diminuir significativamente o nível de desconforto de alguns pacientes (Marsella & Sousa, 2001).

### 5. Infeção cutânea na Dermatite Atópica Canina

A infeção cutânea recorrente é frequentemente observada em cães e no Homem que sofrem de DA (DeBoer & Marsella, 2001b). As pessoas atópicas apresentam suscetibilidade para infeções cutâneas que podem ser causadas por uma grande variedade de microrganismos, incluindo *Staphylococcus* spp., *Malassezia* spp., *Candida* spp., dermatófitos e vírus (H. E. Jones, Reinhardt, & Rimaldi, 1973). Destes microrganismos, apenas o *Staphylococcus* spp. e *Malassezia* spp. foram associados às infeções cutâneas na DAc (DeBoer & Marsella, 2001b). Neste capítulo, vamos apenas focar a nossa atenção para as infeções cutâneas por estafilococos, por ser este o assunto predominante no trabalho experimental.

#### 5.1 Infeção cutânea por estafilococos

Em 1976, *Staphylococcus intermedius* foi reconhecido como sendo uma nova espécie isolada em cães e noutros animais (Hajek, 1976). A maioria dos estafilococos coagulase-positivos (ECP) isolados em canídeos foram identificados como sendo estirpes de *S. intermedius* (Cox et al., 1988). Esta espécie é um microrganismo comensal da microbiota bacteriana da pele de vários animais e, ocasionalmente é um importante agente patogénico

de infecções cutâneas caninas, tais como otite externa, piodermite e abscessos (Bannoehr et al., 2007; Hauschild & Wójcik, 2007; Sasaki et al., 2007). Diversos estudos têm relatado o isolamento frequente de diferentes espécies de estafilococos na pele, tanto em cães saudáveis como em cães doentes. Geralmente *S. intermedius* era a espécie predominante, contudo outros estafilococos podem ser isolados: *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus saprophyticus* (Hauschild & Wójcik, 2007). O nível de diversidade fenotípica e genotípica observada entre os isolados de *S. intermedius* levou alguns investigadores a especularem a existência de um grupo de *S. intermedius* (GSI), agrupando várias espécies ou subespécies (Bannoehr et al., 2007). Recentemente, um estudo japonês, com base em sequências parciais de ADN, identificou a existência de 3 espécies distintas – *S. intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus delphini* – entre os isolados fenotipicamente identificados como *S. intermedius* e sugeriu uma reclassificação da espécie (Bannoehr et al., 2007; Sasaki et al., 2007). O *S. delphini* foi isolado em golfinhos em 1988 (Varardo, Kilpper-Balz, Bravaasco, Satta, & Schleifer, 1988) e o *S. pseudintermedius* foi isolado num gato, num cão, num cavalo e num papagaio em 2005 (Devriese et al., 2005). Os resultados deste estudo sugeriam ainda que a maioria das estirpes do GSI isoladas a partir de locais de infeção ou da flora comensal em cães deveriam ser reclassificadas como sendo estirpes de *S. pseudintermedius* (Sasaki et al., 2007). Assim sendo, optou-se por utilizar esta reclassificação ao longo do trabalho escrito, incluindo na referência de estudos em que ainda se utilizava a classificação de *S. intermedius* em isolados caninos, desde que estes sejam anteriores ao estudo em que é proposta a nova reclassificação.

## 5.2 Fatores de virulência do *S. pseudintermedius*

À semelhança do *S. aureus*, *S. pseudintermedius* produz vários fatores de virulência, incluindo enzimas (coagulase, termonuclease, protease), proteínas de ligação à matriz extracelular (fator aglutinante e proteína A) e toxinas (citotoxinas, toxinas esfoliativas e enterotoxinas). O conhecimento sobre a patogénese desta espécie de estafilococos é ainda muito limitada e a maioria dos seus fatores de virulência não foi estudada em detalhe (Bannoehr & Guardabassi, 2012). No entanto, seguidamente faz-se um resumo da informação atualmente disponível sobre os seus fatores de virulência:

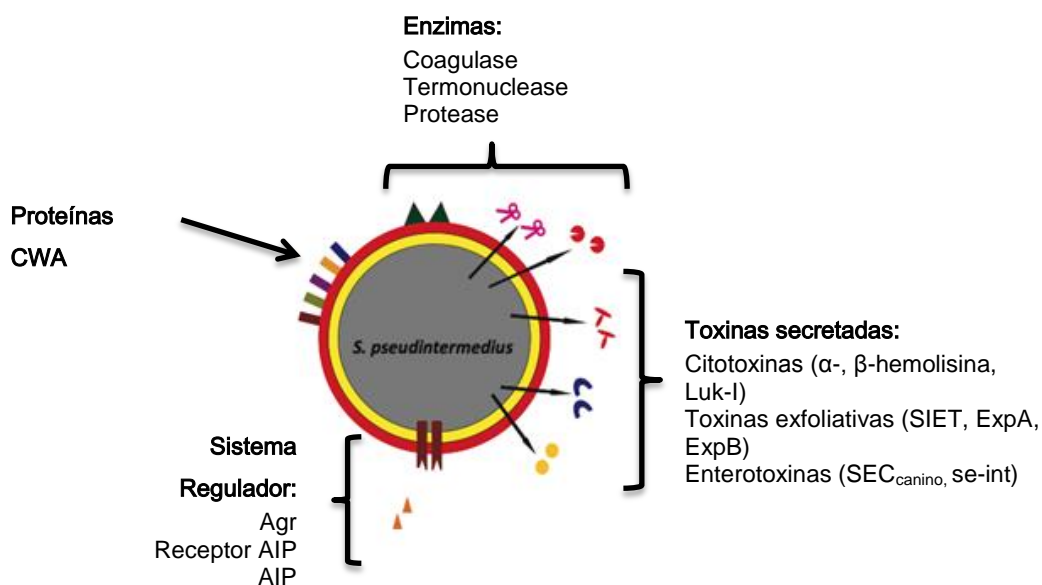
- ❖ Citotoxinas: *S. pseudintermedius* produz  $\alpha$ -hemolisina e  $\beta$ -hemolisina, responsáveis por causar hemólise de eritrócitos de coelho e ovino (Futagawa-Saito, Ba-Thein, Sakurai, & Fukuyasu, 2006; Hajek, 1976). Esta bactéria produz também uma leucotoxina constituída por dois componentes, Luk-1, que se demonstrou ser leucotóxica para os neutrófilos mas é apenas ligeiramente hemolítica para os eritrócitos de coelho (Prevost,

Bouakham, Piemont, & Monteil, 1995). Sabe-se muito pouco sobre a distribuição de Luk-1 na população de *S. pseudintermedius* e o seu papel na patogénese das diferentes infeções caninas (Bannoehr & Guardabassi, 2012). Contudo, dados recentes mostram que o *S. pseudintermedius* resistente à meticilina clone ST71 isolado na Europa contém frequentemente o gene que codifica a Luk-1 (Ruscher et al., 2009), mas a ocorrência relativa deste fator de virulência no *S. pseudintermedius* sensível à meticilina é praticamente desconhecida (Bannoehr & Guardabassi, 2012).

- ❖ Toxinas exfoliativas: A toxina exfoliativa do *S. pseudintermedius*, que possui a abreviatura SIET baseada na sua anterior designação “*Staphylococcus intermedius* exfoliative toxin” demonstrou ter efeitos esfoliativos quando injetada por via subcutânea em cães (Terauchi et al., 2003). Estes animais quando submetidos a esta toxina desenvolvem sinais clínicos (eritema, descamação e crostas) semelhantes aos observados na piodermite canina (Terauchi et al., 2003). Recentemente, mais duas toxinas esfoliativas do *S. pseudintermedius* foram identificadas - ExpA e ExpB (Iyori et al., 2010).
- ❖ Gene regulador acessório (*agr*): com o intuito de melhorar a capacidade de provocar infeção, o estafilococos desenvolveu um sistema denominado *quorum sensing* que permite a comunicação inter-bacteriana (Yarwood & Schlievert, 2003). O *agr* responsável pelo sistema *quorum sensing* tem a capacidade de diminuir a expressão de diferentes proteínas de superfície e aumentar a expressão de diversos fatores de virulência na transição da fase exponencial de crescimento bacteriano para a fase estacionária, *in vitro* (Vuong, Gotz, & Otto, 2000). A ativação deste gene está dependente da densidade populacional bacteriana (Bannoehr & Guardabassi, 2012). Foi descoberto que a expressão do *agr* contribui para a patogénese de diferentes infeções modelo de estafilococos, incluindo abscessos subcutâneos em ratinhos, endocardites em coelho e artrites. E ainda, a sua expressão parece também estar envolvida na invasão e apoptose de células epiteliais (Yarwood & Schlievert, 2003). No *S. aureus* a funcionalidade do *agr* está bem caracterizada e pensa-se que no *S. pseudintermedius* este gene mantenha também a mesma função (Bannoehr & Guardabassi, 2012).
- ❖ Proteínas de ligação à matriz extracelular (CWA do inglês *cell-wall anchored*): a adesão inicial do microrganismo às células epiteliais do hospedeiro é uma exigência necessária para que ocorra a colonização e a infeção bacteriana (Forsythe, Hill, Thoday, & Brown, 2002). Vários estudos têm investigado o potencial do *S. pseudintermedius* em aderir aos corneócitos de cães e de outros hospedeiros, demonstrado que esta bactéria possui, muito provavelmente, na sua superfície adesinas capazes de reconhecer e se ligar a proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina, o fibrinogénio e citoqueratina 10 (Bannoehr & Guardabassi, 2012; Cree & Noble, 1995; Forsythe et al., 2002).

- ❖ **Biofilmes:** Muitas infecções por estafilococos não são causadas por organismos de vida livre, mas por grupos de células que interagem entre si designando-se biofilmes (Yarwood & Schlievert, 2003). Os biofilmes são definidos como uma comunidade de células ligadas a qualquer superfície biótica ou abiótica, estando incorporadas numa matriz autoproduzida e que apresentam geralmente um crescimento e expressão de genes alterada em comparação com as bactérias de vida livre (Donlan & Costerton, 2002). As infecções associadas a biofilmes têm especial relevância clínica porque estas comunidades são geralmente resistentes à antibioterapia e às defesas naturais do hospedeiro (Yarwood & Schlievert, 2003). As infecções por estafilococos associadas a biofilmes incluem endocardite, osteomielite, infecções relacionadas com implantação de dispositivos e ainda algumas infecções cutâneas (Yarwood & Schlievert, 2003).
- ❖ **Superantígenos:** este assunto será abordado detalhadamente mais à frente.

Figura 8: Esquema simplificado dos fatores de virulência produzidos pelo *S. pseudintermedius* (adaptado de Bannoehr & Guardabassi, 2012).



### 5.3 Papel da infecção cutânea por estafilococos na patogénese da DA

O *S. pseudintermedius* é um agente patogénico oportunista. As infecções causadas por esta bactéria ocorrem apenas quando a resistência do hospedeiro está reduzida e a barreira cutânea está alterada por fatores predisponentes, como a DAc, procedimentos médicos ou cirúrgicos e / ou doenças imunossupressoras (Bannoehr & Guardabassi, 2012).

A relação entre estas infecções e a patogénese e sinais clínicos da DAc é complexa e, na maioria dos casos não está completamente esclarecida. As infecções cutâneas podem, em alguns casos, ser consequência das alterações que ocorrerem na pele induzidas pela dermatite atópica, como por exemplo as escoriações autoinduzidas (DeBoer & Marsella, 2001b). Contudo, existem evidências suficientes para sugerir que tais infecções são uma

componente importante na patogênese da DA através dos seus efeitos no sistema imunológico e/ou perpetuando a resposta inflamatória cutânea (DeBoer & Marsella, 2001b).

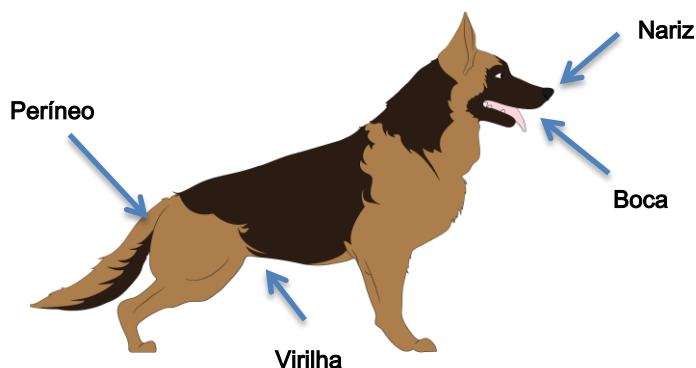
### 5.3.1 Adesão e colonização da pele atópica por estafilococos

Nos humanos, o agente bacteriano que regularmente está associado à infecção cutânea é o *S. aureus* (Leyden, Marples, & Kligman, 1974). A colonização da pele por esta bactéria tem uma correlação positiva com a gravidade da DA humana (Herz, Bunikowski, & Renz, 1998). Supõe-se que o mesmo possa ocorrer na DAc. Um estudo realizado pelo Fazakerley e colegas (2009) demonstrou que a frequência de colonização pelo *S. pseudintermedius* é significativamente maior em cães atópicos (quase 90% dos animais) do que em cães saudáveis (pouco mais de um terço dos animais). Por outro lado um estudo mais recente, refere que a frequência de colonização de *S. pseudintermedius* em cães saudáveis pode variar entre 46 a 92%, aumentando a sensibilidade quando se recolhe amostra de mais de que um local de colonização (Bannoehr & Guardabassi, 2012). Estes resultados podem ser comparados com os de medicina humana, em que 90% dos pacientes com DA são colonizados pelo *S. aureus*, mas apenas 5% dos humanos saudáveis são portadores (Leyden et al., 1974). Nos cães, *S. pseudintermedius* é predominantemente detetado nas mucosas, tais como narinas, boca e períneo, embora também possa ser isolado na pele e pelagem dos animais (Figura 9). Acredita-se que as mucosas são os verdadeiros locais de colonização da bactéria e a sua propagação ocorra durante o “grooming” levando a uma contaminação transitória da pele e do pêlo, e se as condições o permitirem, à colonização e infecção (Fazakerley et al., 2009). O ouvido é provavelmente o único local que é significativamente mais propenso a ser colonizado em cães atópicos do que em cães saudáveis (Fazakerley et al., 2009). Este fato é corroborado por 80% dos cães com DA apresentarem otites recorrentes e que em 20% dos casos este seja o único sinal clínico apresentado (Griffin & DeBoer, 2001). Parece provável, portanto, que a maior prevalência de colonização da mucosa por estafilococos nos cães atópicos está na origem da alta frequência das infecções cutâneas recorrentes observadas nestes animais. As razões para isso permanecem desconhecidas, mas podem também incluir o aumento da adesão da bactéria aos corneócitos, deficiente função da barreira cutânea e alterações no sistema imunitário (Fazakerley et al., 2009).

Um estudo realizado demonstrou que a adesão do *S. pseudintermedius* aos corneócitos é significativamente maior em cães atópicos do que em cães saudáveis (McEwan, 2000). A adesão entre a bactéria e as células epiteliais envolve interações moleculares específicas entre as adesinas da superfície da bactéria e moléculas recetoras da superfície das células epiteliais (Forsythe et al., 2002). Uma explicação provável para este fenómeno de maior adesão dos estafilococos à pele de animais atópicos é que a dermatite atópica, de alguma forma, altera os recetores cutâneos para os estafilococos e este é um dos fatores que

contribui para a alta incidência de piodermite em cães e humanos com DA. Isto pode envolver alterações de número, natureza ou posição dos recetores (McEwan, 2000; Simou, Thoday, Forsythe, & Hill, 2005).

Figura 9: Locais mais comuns de colonização do *S. pseudintermedius* no cão (adaptado de Bannoehr & Guardabassi, 2012). (Imagem gentilmente cedida por Pedro Canilho).



### 5.3.2 Hipersensibilidade aos estafilococos na DA

Em Medicina Humana é cada vez mais reconhecido que a resposta de IgE contra antígenos de estafilococos desempenha um papel importante na patogénese da DA. Na maioria dos estudos, os níveis de IgE alérgico-específica correlaciona-se com a gravidade da doença (Bexley, Nuttall, Hammerberg, Fitzgerald, & Halliwell, 2013). Estudos em pessoas demonstram que o *S. aureus* pode induzir reações cutâneas de hipersensibilidade imediata e tardia, indicando que o reconhecimento de alérgenos de *S. aureus* pelas células T e pela IgE pode contribuir para a inflamação cutânea na DA humana, assim sendo o *S. aureus* deve ser considerado como uma fonte de alérgenos para pacientes com DA (Reginald et al., 2011)

Nos canídeos, a evidência de existência de “hipersensibilidade bacteriana” é limitada (DeBoer & Marsella, 2001b). Inicialmente esta ideia surgiu pela observação de determinados sinais clínicos, alguns cães com DAc e infeções cutâneas por estafilococos apresentavam um eritema grave e lesões muito pruriginosas que pareciam ser “reações alérgicas” (DeBoer & Marsella, 2001b). Posteriormente, certos critérios histológicos e reações positivas aos testes intradérmicos utilizando extrato de estafilococos foram utilizados como evidência para apoiar o conceito de hipersensibilidade bacteriana (Scott, MacDonald, & Schultz, 1978). Um estudo realizado recentemente avaliou a resposta humoral canina contra antígenos de estafilococos, concluindo que cães atópicos apresentam níveis significativamente mais elevados de IgE anti-estafilococos no soro do que cães saudáveis. Para além disto, estes animais apresentavam níveis significativamente mais elevados de IgE anti-estafilococos do que cães com infeção por estafilococos secundária a outra causa (Bexley et al., 2013). Os níveis de imunoglobulinas G (IgG) eram também significativamente mais elevados em cães

atópicos quando comparados com animais saudáveis. No entanto, não existiam diferenças significativas entre animais atópicos e cães com infecção por estafilococos secundária a outra causa (Bexley et al., 2013). Estes resultados sugerem que componentes dos estafilococos podem servir de alérgenos para alguns cães, estimulando a resposta de IgE contra a bactéria (DeBoer & Marsella, 2001b). No entanto, é preciso ter em consideração que a presença de níveis elevados de IgE anti-estafilococos em cães não atópicos com piodermite enfatiza o facto de este anticorpo não ser exclusivo de cães que sofrem de DAc (Bexley et al., 2013).

### **5.3.3 O papel dos superantigénios na DA**

Durante a infecção, os estafilococos coagulase positivos (ECP) libertam uma variedade de toxinas para o tecido circundante. Nos seres humanos, está bem estabelecido que algumas destas toxinas servem como "superantigénios", isto é, moléculas que ativam diretamente e não especificamente um grande número de linfócitos T. Estas toxinas facilitam também a migração de linfócitos para o local de inflamação da pele, e regulam a libertação de citocinas pró-alérgicas. Assim, a própria infecção bacteriana atua para amplificar e manter a resposta alérgica na pele (Marsella & Olivry, 2003). Embora se saiba que as estirpes de estafilococos isoladas em infeções cutâneas caninas também produzem exotoxinas, desconhece-se se estas toxinas têm uma função de superantigénios no sistema imunitário do cão (DeBoer & Marsella, 2001b).

## **5.4 Prevalência e importância dos *Staphylococcus* spp. meticilina resistentes na infecção cutânea canina**

Durante as últimas décadas, a prevalência de estirpes de *Staphylococcus* spp. resistentes aos antibióticos, especialmente os resistentes à meticilina, aumentou substancialmente tanto em medicina humana como em medicina veterinária (Coyner, 2013). As infeções cutâneas associadas a *Staphylococcus* spp. resistentes aos antibióticos são cada vez mais frequentes nos animais de companhia e, isto representa um verdadeiro desafio para o seu tratamento (Cain, 2013). A resistência à meticilina é o mecanismo de resistência aos antibióticos mais importante nos estafilococos (Cain, 2013). Esta resistência é transmitida pelo gene *mecA*, que se localiza num elemento genético móvel designado cassete estafilocócica cromossómica *mec* (*SCCmec*) e codifica a proteína de ligação à penicilina alterada (PLP2a). A produção de PLP2a pela bactéria determina a resistência à meticilina, não permitindo a ligação dos antibióticos beta-lactâmicos, tais como penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos (Cain, 2013; Coyner, 2013). Os estafilococos resistentes à meticilina foram identificados nas espécies pecuárias nos anos 70 (Coyner, 2013). Contudo, só nos anos 90 foram identificados e isolados esporadicamente na espécie canina (Coyner, 2013).

Atualmente, as infecções associadas aos estafilococos resistentes à meticilina são frequentemente descritas na literatura veterinária (Cain, 2013), incluindo em Portugal (Couto, Belas, Couto, Perreten, & Pomba, 2013; Couto, Pomba, Moodley, & Guardabassi, 2011).

#### **5.4.1 *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP)**

O MRSP é um potencial agente patogénico para cães, gatos e cavalos e está geralmente associado a piodermite, otite, infecção do trato urinário, feridas, infecções das zonas cirúrgicas e septicemia (Cain, 2013). Nos Estados Unidos da América (EUA) dois estudos retrospectivos documentaram a prevalência de MRSP em 15,6% (R. D. Jones, Kania, Rohrbach, Frank, & Bemis, 2007) e 17% (Morris, Rook, & Shofer, 2006). Desde essa altura, o isolamento de MRSP em amostras clínicas parece ter aumentado, e em 2008 cerca de 30% dos *S. pseudintermedius* isolados no laboratório de bacteriologia veterinário da Universidade de Tennessee eram resistentes à meticilina (Bemis, Jones, Frank, & Kania, 2009). A prevalência de MRSP em piodermite canina varia consoante a área geográfica. Por exemplo, um estudo recente realizado no Japão determinou esta prevalência na ordem dos 66,7% (Kawakami et al., 2010), no entanto infecções por MRSP apenas foram documentadas recentemente na Europa e as taxas de isolamento de amostras clínicas são baixas, mas com tendência a aumentarem (Loeffler et al., 2007; Ruscher et al., 2010). O MRSP também já foi isolado em cães e gatos saudáveis, mas com prevalências relativamente mais baixas quando comparado com animais doentes (Cain, 2013).

Embora o MRSP não seja necessariamente mais virulento do que o *S. pseudintermedius* suscetível à meticilina (MSSP) (Cohn & Middleton, 2010), o tratamento de infecções por este agente representa um desafio clínico devido aos isolados apresentarem multirresistência a diversos antibióticos (Cain, 2013). As altas taxas de resistência a antibióticos que não pertencem à classe de beta-lactâmicos, como macrólidos, lincosamidas, tetraciclina, fluoroquinolonas e sulfonamidas potenciadas foram relatados nos EUA, Europa e Ásia (Bemis et al., 2009; Loeffler et al., 2007; Ruscher et al., 2010). A resistência a estes antibióticos adicionais não é transmitida pelo gene *mecA*. Os isolados de MRSP exibem geralmente suscetibilidade aos seguintes antibióticos: ácido fusídico, mupirocina, amicacina, rifampicina, vancomicina, linezolida e teicoplanina (Bond & Loeffler, 2012; Loeffler et al., 2007). A suscetibilidade ao cloranfenicol é variável, na Europa vários isolados de MRSP são resistentes (Bond & Loeffler, 2012), enquanto nos EUA verifica-se uma boa suscetibilidade a este antibiótico (Bemis et al., 2009; Cain, 2013).

Os fatores de risco para a aquisição de MRSP nos animais incluem utilização prévia de antibióticos sistémicos, a existência de internamentos anteriores (Coyner, 2013) e residirem em zonas urbanas (Cain, 2013). Este facto sugere que a utilização de antibioterapia sistémica altera a flora estafilocócica comensal da pele dos pacientes, permitindo a



colonização da pele por estirpes meticilina resistentes (Cain, 2013). Assim sendo, a emergência de estirpes de MRSP pode dever-se à pressão de seleção derivado da utilização de antibióticos ou à disseminação horizontal (Coyner, 2013). A colonização de animais saudáveis com MRSP ocorre através da transmissão a partir de lesões clinicamente ativas de cães com MRSP e diminui após a resolução da infecção (Cain, 2013). Estas infecções causadas por estirpes resistentes são tratadas com sucesso apesar de geralmente necessitarem de um período mais longo de tratamento (Coyner, 2013). Este facto verificou-se num estudo em que foram avaliados os resultados de tratamento em 93 cães com piodermite por MRSP comparativamente a 123 casos de cães com piodermite por MSSP, verificando-se que todas as piodermites foram resolvidas independentemente da suscetibilidade à meticilina do agente, embora alguns casos de MRSP tenham necessitado de mais tempo de terapêutica comparativamente a cães com MSSP (Beyan et al., 2012). A cura clínica de MRSP não equivale à cura microbiológica, ou seja animais que inicialmente tinham piodermite por MRSP muito provavelmente ficam colonizados por esta estirpe (Coyner, 2013).

## **6. Diagnóstico da Dermatite Atópica**

O diagnóstico definitivo da DAc é difícil de realizar porque nenhum dos sinais clínicos característicos são patognomónicos da doença. Ao longo dos tempos, foram propostos vários conjuntos de critérios de modo a facilitar o diagnóstico inicial da DA (Favrot et al., 2010). Alguns autores consideram a DA um diagnóstico de exclusão, sendo necessário descartar todas as outras causas de prurido (DeBoer & Hillier, 2001a). Porém, os critérios de diagnóstico podem ser úteis tanto em estudos clínicos como na prática clínica, desde que utilizados adequadamente e conhecendo as suas limitações em termos de sensibilidade e especificidade (Favrot et al., 2010).

Em 2010, Favrot e colegas publicaram um novo conjunto de critérios históricos e clínicos que auxiliam no diagnóstico da DAc (Tabela 2) (Nuttal et al., 2013). A combinação de 5 destes oito critérios têm uma sensibilidade de 85% e uma especificidade de 79% para diagnosticar cães com DA. Ao adicionar um sexto critério, a especificidade aumenta para 89% mas a sensibilidade diminui para 58% (Olivry, 2010). Os critérios de Favrot para a DAc podem ser utilizados na prática clínica, mantendo em mente que estes critérios não são absolutos: 1 em cada 5 casos (20%) pode ser mal diagnosticado se estes critérios forem aplicados de forma rigorosa. No entanto, é expectável que ao descartar ectoparasitoses e infeções cutâneas a especificidade do diagnóstico aumente marcadamente (Olivry, 2010).

Tabela 2: Critérios propostos por Favrot e colegas em 2010 (adaptado de Olivry, 2010).

Dermatite Atópica Canina	
1.	Início dos sinais clínicos antes dos 3 anos de idade
2.	Animais que vivem em ambientes de interior (dentro de casa)
3.	Prurido que responde ao tratamento com glucocorticoides
4.	<i>Pruritus sine matéria</i> (no início, o prurido precede as lesões)
5.	Membros anteriores afetados
6.	Face côncava do pavilhão auricular (face interna) afetada
7.	Não afeta as margens das orelhas (sinal mais consistente com Sarcóptes)
8.	Não afeta a área dorsolombar (sinal característico de DAPP)

## 6.1 Testes alérgicos

Após realizado o diagnóstico de DA, podem ser realizados testes alérgicos. Os testes alérgicos não determinam definitivamente a presença de alergia. Ou seja, quando se realiza um teste serológico em que é quantificada a presença de IgE alérgénio-específica no soro ou quando é realizado um teste intradérmico em que há desgranulação dos mastócitos após exposição ao extrato de alérgénios, ambas as situações são na maioria das vezes, mas não sempre, indicativas de alergia. Nenhum teste alérgico é completamente sensível e específico. Animais clinicamente saudáveis podem ter reações positivas nestes testes, mesmo na ausência de sinais clínicos de alergia. Os testes alérgicos não devem ser utilizados como meios de diagnóstico da DA, mas sim quando já existe fortes evidências de alergia e todos os outros diagnósticos diferenciais foram considerados e excluídos. A verdadeira utilidade dos testes alérgicos consiste principalmente na realização de um diagnóstico clínico cuidadoso, mas principalmente na seleção de alérgénios candidatos à imunoterapia e, como base para instituir medidas de evicção de alérgénios (DeBoer & Hillier, 2001a).

### 6.1.1 Testes intradérmicos

Os testes intradérmicos (TID) são praticados há décadas tanto em Medicina Humana como em Medicina Veterinária. A grande utilidade do teste intradérmico é demonstrar a existência de uma resposta de hipersensibilidade ao alérgénio mediada por IgE. Os alérgénios são moléculas com a capacidade de induzir uma resposta imunitária tanto em humanos como em animais. Quando estimulados, a maioria dos pacientes alérgicos responde com a produção de IgE específica para alérgénios presentes no material de origem (Larsen & Dreborg, 2008). Em medicina veterinária, acredita-se que os TID quando realizados de acordo com os princípios e critérios estabelecidos para este procedimento são uma

ferramenta valiosa na demonstração de hipersensibilidade específica para determinados alergénios no cão (Hillier & DeBoer, 2001). No entanto, a presença de uma reação positiva num TID nem sempre é indicativo de alergia, às vezes este resultado pode significar a existência de uma hipersensibilidade subclínica. Apesar do uso dos TID estar muito difundido entre médicos veterinários dermatologistas, a sua utilidade pode ser bastante reforçada pelo uso de extratos de alergénios padronizados e critérios homogéneos para a interpretação dos resultados (Hillier & DeBoer, 2001). A maioria dos veterinários dermatologistas preferem utilizar sedação para a realização dos TID, de modo a melhorar a colaboração do paciente e facilitar a realização do teste (Hillier & DeBoer, 2001). Os sedativos e anestésicos que não afetam a reatividade da pele e que podem ser utilizados nestes testes incluem hidrocloreto de xilazina, medetomidina, tiletamina/zolazepam, tiamilal, halotano, isoflorano e metoxiflurano (Beale, Kunkle, Chalker, & Cannon, 1990).

## **6.2 Diagnóstico da infeção cutânea bacteriana secundária**

### **6.2.1 Apresentação clínica**

A piodermite pode ser classificada consoante a profundidade da infeção bacteriana, como superficial ou profunda (Scott et al., 2001). A piodermite superficial é restrita à epiderme e não penetra abaixo da membrana basal (Beco et al., 2013). Esta piodermite é, geralmente, exsudativa e as suas lesões incluem pápulas, pústulas, colaretes, escamas e crostas. O prurido normalmente está presente (Beco et al., 2013). A piodermite profunda é caracterizada por afetar as camadas abaixo da membrana basal até à derme ou ainda, afetar tecidos mais profundos (Beco et al., 2013). As lesões características desta piodermite são nódulos, úlceras, bolhas hemorrágicas e fístulas que drenam líquido hemorrágico ou secreção purulenta e crostas. As lesões são muitas vezes dolorosas, mas a presença de prurido é pouco comum (Beco et al., 2013).

### **6.2.2 Citologia cutânea**

De uma maneira geral, a citologia cutânea é utilizada frequentemente na dermatologia veterinária pois são uma boa ferramenta de diagnóstico, permitindo diagnosticar infeções bacterianas e/ou fúngicas através da visualização de bactérias, fungos e/ou leveduras e células inflamatórias (Brazis & Pol). Consoante a zona anatómica e o tipo de lesão podem utilizar-se diferentes técnicas de recolha de amostra:

- ❖ Técnica da fita-cola – a sua utilização é indicada para avaliar a presença de *Malassezia* e de bactérias que residam na superfície da pele ou para identificar células inflamatórias como os neutrófilos. Cola-se um pedaço de fita-cola na superfície a analisar, pressiona-se e descola-se a fita-cola da pele. Posteriormente, procede-se à coloração da fita-cola pela técnica de Diff Quick ou Giemsa, não sendo necessário utilizar a solução de

fixação. Por último, coloca-se a fita-cola já corada numa lâmina e observa-se ao microscópio (Brazis & Pol).

- ❖ Impressão direta em lâmina – Utilizada quando a pele se apresenta gordurosa, húmida ou com pus. Esta técnica também é útil quando o animal apresenta pústulas intactas, que previamente são rompidas. A lâmina é pressionada sobre a superfície de pele a analisar, de modo a que o material cutâneo presente fique aderente à lâmina. Antes de realizar a coloração pela técnica de Diff Quick ou Giemsa, deixa-se secar ao ar ou através da aplicação de uma fonte de calor (Brazis & Pol).
- ❖ Técnica da zaragatoa – nos pavilhões auriculares, espaços interdigitais e pregas cutâneas é indicado a utilização de uma zaragatoa estéril para a recolha do material a analisar. Uma vez recolhida a amostra, esta é colocada numa lâmina por rolamento, deixa-se secar e posteriormente faz-se a coloração pela técnica de Diff Quick ou Giemsa (Brazis & Pol).

A citologia cutânea é então um método rápido, fácil e económico, possibilitando detetar a presença de infeção e visualizar microrganismos envolvidos. (Beco et al., 2013).

Os neutrófilos são células predominantes na maioria dos casos de piodermite. A visualização de neutrófilos degenerados são uma boa indicação de infeção. Todas as bactérias coradas pelo método de Diff Quick ou Giemsa coram de azul e a sua identidade pode ser aferida a partir da sua morfologia e do conhecimento de quais os microrganismos que tipicamente estão presentes na maioria das citologias. No entanto, a sua completa identificação exige a realização de mais testes fenotípicos e culturas bacterianas. A síndrome de sobrecrecimento bacteriano é caracterizado por um grande número de bactérias, que muitas vezes apresentam diversas formas, com nenhuma ou com um número reduzido de células inflamatórias associadas. A visualização de bactérias intracitoplasmáticas é um indicador definitivo de infeção. A presença de bactérias extracelulares, particularmente em números baixos, pode não ter relevância clínica e ser devida à microbiota normal da pele (Beco et al., 2013).

### **6.2.3 Testes e culturas bacterianas**

Não é necessário realizar cultura bacteriana e os testes de suscetibilidade aos antibióticos (TSA) em todas as situações. Alguns microrganismos, como os estafilococos, têm um padrão de sensibilidade aos antibióticos relativamente previsível e a seleção de antibioterapia empírica é muitas vezes bem-sucedida. No entanto, existem situações em que se torna necessário identificar o agente microbiano envolvido na infeção através de cultura bacteriana e determinar a sua suscetibilidade aos antibióticos (Tabela 3) (Beco et al., 2013).

Tabela 3: Critérios para realizar culturas bacterianas e TSA (adaptado de Beco et al., 2013).

Critérios para a realização de culturas e TSA
<p>Infeções que põem em risco a vida do animal;</p> <p>Lesões clínicas consistentes com piodermite profunda;</p> <p>Sinais clínicos e citologia não concordantes um com o outro;</p> <p>Bactérias em forma de bastonetes na citologia, porque a sua sensibilidade aos antibióticos não é previsível;</p> <p>Terapêutica antimicrobiana empírica não resolve a infecção como era esperado</p>

O material para cultura bacteriana pode ser obtido por uma variedade de meios (zaragatoa, biópsia) dependendo das lesões envolvidas. É fundamental obter amostras representativas e evitar contaminações de superfície que podem não ser relevantes (Beco et al., 2013). O *S. pseudintermedius* tem sido tradicionalmente identificado pela morfologia da colônia ou por testes fenotípicos padronizados. As colônias são de tamanho médio, com relevo, despigmentadas e exibem hemólise em meio agar sangue de bovino ou ovino. Geralmente, investigadores treinados e experientes conseguem distinguir pela morfologia da colônia estirpes de *S. pseudintermedius* de estirpes de *S. aureus* devido às diferenças de coloração e padrões de hemólise. É possível também fazer a distinção de espécies coagulase-negativo, uma vez que estas apresentam colônias ligeiramente mais pequenas e não exibem hemólise, exceto *S. haemolyticus* (Bannoehr & Guardabassi, 2012).

Os testes comerciais de aglutinação rápida em lâmina que são usados frequentemente em laboratórios de diagnóstico de medicina humana para a identificação de *S. aureus* não são adequados para realizar a identificação de *S. pseudintermedius*, uma vez que esta bactéria apresenta um resultado negativo neste teste, que deteta fatores aglutinantes na superfície da parede celular, como a proteína A ou antigénios de superfície (Bannerman, 2003). Os testes fenotípicos mais fidedignos para a diferenciação de *S. pseudintermedius* de outras espécies de estafilococos isoladas a partir de amostras caninas são:

- ❖ Coagulase – deteta a presença de coagulase, que causa a coagulação de plasma de coelho *in vitro*. É um teste importante para diferenciar estafilococos coagulase-positivos de estafilococos coagulase-negativos;
- ❖  $\beta$ -Galactosidase – demonstra a presença de uma enzima que degrada a lactose em galactose ou glucose;
- ❖ Pirrolidonil Arilamidase – determina a atividade da enzima L-pirrolidonil arilamidase e é utilizado para a identificação de *Streptococcus*;
- ❖ Acidificação de D-manitol – indica a capacidade de fermentar o manitol. Uma reação positiva, ou seja a acidificação do meio, é demonstrada pela mudança de cor do meio que delimita as colônias de vermelho para amarelo;
- ❖ Resistência à polimixina B;
- ❖ Produção de acetoina.

Tabela 4: Testes fenotípicos para distinção de *Staphylococcus pseudintermedius* de outras espécies de estafilococos (adaptado de Bannoehr & Guardabassi, 2012).

Testes Fenotípicos	Espécies de estafilococos				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. delphini</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. schleiferi</i>
Fator Aglutinante	+	-	d	-	-
Hemólise	+	+	d	+	+
Coagulase	+	+	+	+	d
β-Galactosidase	-	+	+	+	(+)
Pirrolidonil Arilamidase	-	-	-	-	+
D-manitol	+	(d)	(d)	(d)	-
Polimixina B	R	S	S	S	S

Legenda: +, ≥ 90% de estirpes positivas; -, ≥ 90% de estirpes negativas; d, 11 – 89% de estirpes positivas; (), indica uma reação retardada

Através da análise da tabela anterior (Tabela 4) é possível perceber que o *S. pseudintermedius* não pode ser claramente distinguido das outras espécies do GSI por métodos fenotípicos. Assim sendo, para a correta identificação da espécie é necessário utilizar métodos moleculares, como *polymerase chain reaction* (PCR). O PCR com base no gene *termonuclease (nuc)* mostrou ser sensível (99.8%) e específico (100%) na identificação rotineira de espécies ECP com relevância em veterinária (Bannoehr & Guardabassi, 2012).

### III. PARTE EXPERIMENTAL

---

#### 1. Objetivos

O estudo realizado foi composto por duas fases experimentais distintas. Numa primeira fase, o objetivo foi definir qual a concentração adequada de um extrato de *S. pseudintermedius* a utilizar em testes intradérmicos. Na fase seguinte, a intenção do estudo foi determinar a prevalência de hipersensibilidade ao *S. pseudintermedius* em cães atópicos com infecção cutânea recorrente e avaliar se existia correlação com a história clínica do animal.

#### 2. Determinação prévia da concentração de extrato de *Staphylococcus pseudintermedius* a utilizar nos testes intradérmicos

##### 2.1 Materiais e Métodos

##### 2.1.1 Extrato de alergénios de *S. pseudintermeius*

Para iniciar o estudo foi necessário preparar um extrato de alergénios de *S. pseudintermedius* para usar nos testes dermatológicos cutâneos, uma vez que este tipo de extrato não se encontrava disponível no mercado. Este foi preparado no Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas da FMV-UL, a partir de uma estirpe isolada de um cão com piodermite bacteriana profunda e, posteriormente, foi gentilmente fornecido ao serviço de Dermatologia do Hospital Escolar da FMV-UL para a realização deste projeto, sendo o protocolo de extração confidencial. O extrato fornecido foi produzido a partir de um extrato de *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP), estirpe 5819/10, com os seguintes genes de virulência: *luk-1*, *se-int*, *siet*, *speta*, *ebpS* e *spsL*.

De acordo com estudos já realizados para *Malassezia pachydermatis* (Bond, Curtis, Hendricks, Ferguson, & Lloyd, 2002; Bond, Patterson-Kane, & Lloyd, 2002) e não havendo nenhuma concentração de extrato de *S. pseudintermedius* validada para uso em testes intradérmicos, decidiu-se utilizar as seguintes concentrações: 2 µg/ml, 20 µg/ml e 200 µg/ml. Tornou-se então necessário determinar qual destas concentrações seria a adequada a utilizar nos testes intradérmicos de animais atópicos, com o objetivo de chegar a um diagnóstico de hipersensibilidade ao *S. pseudintermedius*. Para isso, foi necessário previamente testar estas três concentrações em animais saudáveis. Tal foi realizado, após concedida a autorização da Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da FMV – UL, tendo em consideração o facto de o procedimento não ser doloroso e não ter qualquer influência no estado de saúde do animal.

### 2.1.2 Seleção dos animais do grupo controlo

O grupo controlo era composto por 24 canídeos saudáveis, sem história clínica de prurido e de infeção cutânea bacteriana. Todos os animais incluídos neste grupo deveriam respeitar os critérios de inclusão estabelecidos (Tabela 5), para isso procedeu-se ao apuramento e registo da história clínica do animal (Anexo II). Após o levantamento da história clínica e de esclarecido o procedimento, os proprietários que voluntariamente decidiram participar no estudo assinaram um termo de autorização (Anexo I). Foi também realizado um exame de estado geral e um exame dermatológico a todos os cães saudáveis incluído no grupo controlo.

Tabela 5: Critérios de inclusão delineados para o grupo controlo

Critérios de inclusão
Animais com idade superior ou igual a 1 ano
Sem raça ou sexo específico
Sem história clínica de prurido
Sem história clínica de piodermite bacteriana
Ausência de lesões cutâneas de origem bacteriana
Exame físico e dermatológico normais
Controlo adequado de ectoparasitas
Privação farmacológica de anti-histamínicos e corticosteróides, no mínimo, nos 15 dias que antecederam os testes intradérmicos

### 2.1.3 Citologia Cutânea

Nos canídeos do grupo controlo, a citologia cutânea foi realizada a partir dos locais mais comuns de colonização do *S. pseudintermedius*, como as virilhas e as axilas. A técnica frequentemente utilizada foi a da fita-cola, como descrito no subcapítulo 6.2.2 citologia cutânea. A interpretação da citologia cutânea teve como critério a observação de cocos intracelulares em células inflamatórias e a observação de polimorfonucleares neutrófilos degenerados, considerando-se nestes casos a citologia compatível com piodermite bacteriana, sendo o agente mais provável o *S. pseudintermedius*.

### 2.1.4 Testes Intradérmicos

Para a realização dos testes intradérmicos, os animais foram sedados utilizando um protocolo de medetomidina (10 µg/kg, IV ou IM) e o local de injeção dos alérgenos preparado. Realizou-se tricotomia da zona lateral do tórax e com uma caneta à prova de água marcou-se o local de administração de cada alérgeno com uma distância de 3 cm entre cada um. A cada animal foi administrado um controlo positivo (fosfato de histamina



0,001%), um controlo negativo (PBS 0,9%) e três concentrações diferentes de extrato de *S. pseudintermedius* (Figura 10). Este extrato foi obtido de forma a não conter nenhuma colónia viva que pudesse conduzir a uma infeção. A utilização do PBS a 0,9% como controlo negativo deveu-se ao facto de este ser o excipiente utilizado no extrato. Os controlos e o extrato de alergénios de *S. pseudintermedius* foram administrados usando agulhas de 26 gauge (agulhas de tuberculina) e seringas de 1 ml (seringas de insulina). O volume administrado foi de 0,05 ml por via intradérmica.

As reações imediatas foram lidas 15 minutos após a injeção através de uma escala, que avaliou a intensidade e/ou o tamanho do eritema, a turgidez e/ou a formação de pápula. As reações obtidas nos testes intradérmicos realizados foram classificadas de 0 a 4 (++++), de acordo com estudos já publicados (Hillier & DeBoer, 2001) (Tabela 6). Todas as reações iguais ou superiores a 2 (++) foram consideradas positivas (Hillier & DeBoer, 2001).

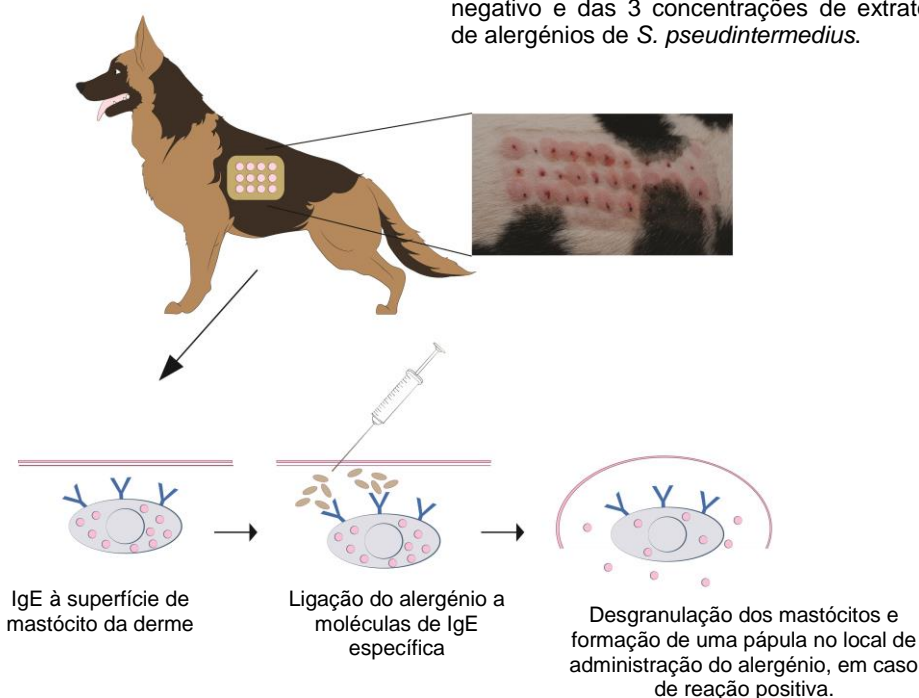
Tabela 6: Classificação das reações imediatas obtidas nos TID utilizando uma escala.

Escala	Significado
0	Igual à reação do controlo negativo
+	Reação intermédia entre 0 e ++
++	Intermédio entre a reação do controlo positivo e do controlo negativo
+++	Reação intermédia entre ++ e ++++
++++	Igual à reação do controlo positivo

Figura 10: Esquema simplificado do procedimento dos TID (adaptado de Lourenço Martins, 2010) (Imagem gentilmente cedida por Pedro Canilho).

(1) O animal é sedado e o local para injeção dos alergénios é preparado.

(2) São realizados as injeções intradérmicas de 0,05 ml do controlo positivo, do controlo negativo e das 3 concentrações de extrato de alergénios de *S. pseudintermedius*.

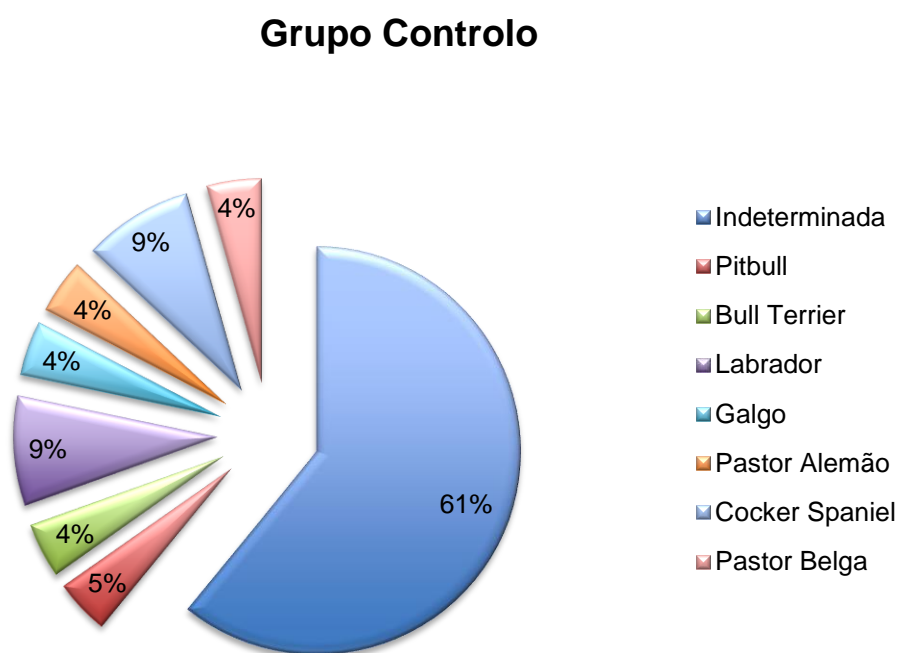


## 2.2 Resultados

O grupo controlo era inicialmente constituído por 24 canídeos, no entanto 1 dos canídeos foi excluído deste grupo porque apresentava alterações no seu exame físico, nomeadamente mucosas pálidas e tempo de repleção capilar (TRC) superior a 2 segundos. Tendo em conta a história pregressa do animal, decidiu-se não realizar a sedação nem os TID e, reencaminhou-se o animal para o serviço de Medicina Interna. No exame físico e dermatológico dos restantes canídeos não se verificaram alterações, o que permitiu avançar para a realização dos testes intradérmicos.

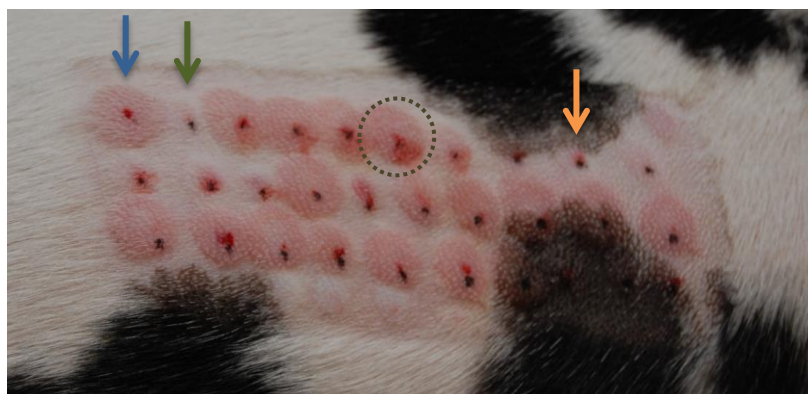
O grupo controlo era então constituído por 23 cães saudáveis não atópicos, dos quais 11 eram machos e 12 eram fêmeas com idades compreendidas entre 1 e 13 anos, sendo a média de idades de 5,15 anos ( $\pm 3,73$ ). O grupo era representado na sua maioria por animais de raça indeterminada, no entanto estavam presentes as seguintes raças: Labrador Retriever, Bull Terrier, Pastor Alemão, Pastor Belga, Cocker Spaniel, Galgo, e Pitbull (Gráfico 2).

Gráfico 2: Representatividade de raças no grupo controlo.



Todos os animais incluídos neste grupo controlo apresentaram reações positivas ao controlo positivo (fosfato de histamina 0,001%). Para cada animal individualmente, estas reações foram consideradas como sendo a reação positiva mais forte, ou seja, de classificação 4 (++++). Da mesma forma, como era esperado os 23 canídeos apresentaram reações negativas ao controlo negativo, sendo que estas foram classificadas como 0.

Figura 11: Resultado de um teste alérgico intradérmico, exibindo diversas reações positivas a vários alérgenos testados (Fotografia original da autora).



Legenda: seta azul corresponde ao controlo positivo; seta verde corresponde ao controlo negativo; circunferência cinza demarca uma reação positiva muito forte de classificação ++++; seta cor de laranja indica uma reação negativa.

Dos vinte e três canídeos testados nesta primeira fase do estudo ( $n=23$ ), catorze (60,9%) apresentaram reação positiva ao extrato de MRSP na concentração de 200  $\mu\text{g/ml}$ , sendo que estas reações variaram entre as classificações 2 (++) e 3 (+++). Das 14 reações positivas que se verificaram na maior concentração, dez foram reações positivas de classificação 2 (++) e quatro de classificação 3 (+++). Pelo contrário, considerando a concentração de 20  $\mu\text{g/ml}$  apenas um cão (4,5%) exibiu uma reação positiva ligeira, ou seja, de classificação 2 (++) . A concentração de 2  $\mu\text{g/ml}$  não deu origem a nenhuma reação positiva (Gráfico 3).

Gráfico 3: Resultados obtidos nas três concentrações de extrato de *S. pseudintermedius* nos animais do grupo controlo.

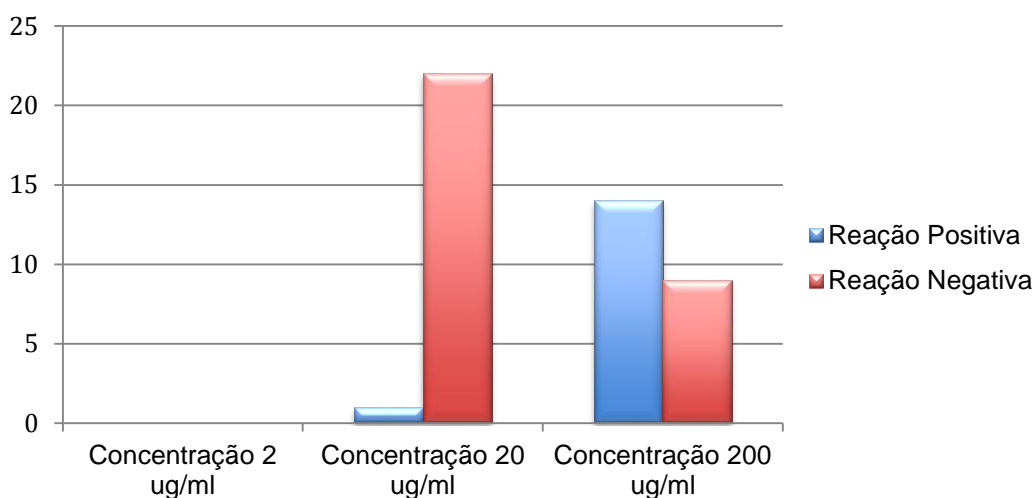
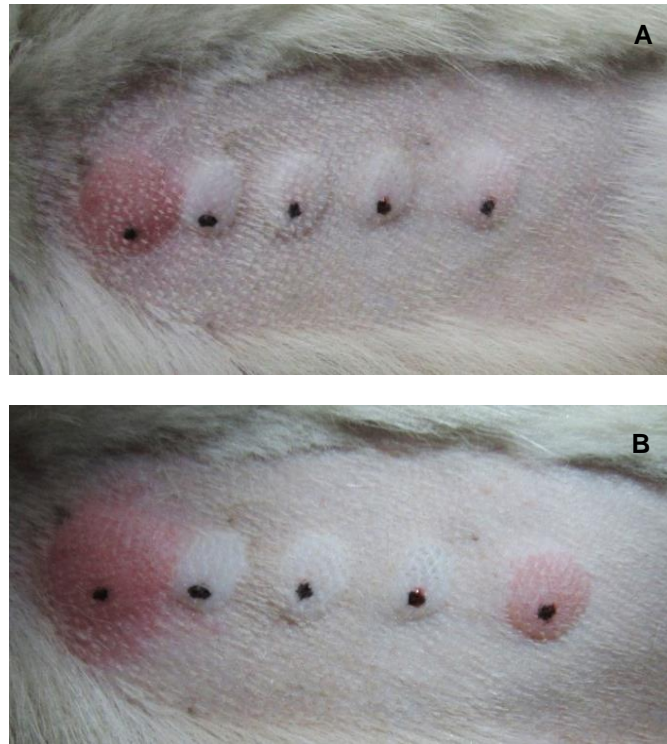


Figura 12: **A** - Resultado de um teste intradérmico ao extrato de *S. pseudintermedius*, momentos após as administrações. **B** – Resultado do mesmo teste intradérmico ao extrato de *S. pseudintermedius*, cerca de 15 minutos após realizadas as administrações. (Fotografias gentilmente cedidas pela Dra. Natacha Couto)



Legenda: **A** – Cada ponto preto corresponde ao local de administração, da esquerda para a direita, do controlo positivo, controlo negativo, extrato de *S. pseudintermedius* na concentração de 2 µg/ml, 20 µg/ml e 200 µg/ml. Visualização de reação positiva apenas no local de administração do controlo positivo. **B** – Cada ponto preto corresponde ao local de administração, da esquerda para a direita, do controlo positivo, controlo negativo, extrato de *S. pseudintermedius* na concentração de 2 µg/ml, 20 µg/ml e 200 µg/ml. A reação positiva observada na concentração de 200 µg/ml de extrato de *S. pseudintermedius* corresponde a uma reação de classificação 3 (+++).

Tabela 7: Resultados obtidos nos TID dos 23 animais incluídos no grupo controle, após administração das três concentrações do extrato de *S. pseudintermedius*.

Nº	Controlo Positivo	Controlo Negativo	Concentração 2 ug/ml	Concentração 20 ug/ml	Concentração 200 ug/ml
1	++++	0	0	++	+++
2	++++	0	0	0	+++
3	++++	0	0	0	0
4	++++	0	0	0	++
5	++++	0	0	0	+++
6	++++	0	0	+	++
7	++++	0	0	0	++
8	++++	0	0	0	++
9	++++	0	0	0	++
10	++++	0	0	0	++
11	++++	0	0	0	0
12	++++	0	0	0	++
13	++++	0	0	0	++
14	++++	0	0	0	++
15	++++	0	0	0	+++
16	++++	0	0	0	++
17	++++	0	0	0	0
18	++++	0	0	0	0
19	++++	0	0	0	0
20	++++	0	0	0	0
21	++++	0	0	0	0
22	++++	0	0	0	0
23	++++	0	0	0	0

## 2.3 Discussão

Para determinar qual a concentração ideal de extrato de alergénios de *S. pseudintermedius* a utilizar nos TID de pacientes atópicos, de modo a ser possível diagnosticar hipersensibilidade bacteriana, é necessário em primeiro lugar avaliar a reatividade deste extrato em diferentes concentrações em animais saudáveis. A literatura de referência sugere que a concentração de extrato de alergénio a ser utilizada em testes intradérmicos deve ser a maior concentração disponível que não cause uma reação positiva em mais de 10% dos cães saudáveis testados (Reedy, Miller, & Willemse, 1997). Assim sendo, após a análise dos resultados obtidos concluímos que a concentração de 200 µg/ml não deve ser utilizada em testes intradérmicos. O número elevado de reações positivas (60,9%) verificadas em

cães saudáveis na concentração de 200 µg/ml deve-se, provavelmente, a reações falso-positivas. Estas reações possuem características semelhantes às observadas nas reações de hipersensibilidade mediadas por IgE contra o alérgeno, nomeadamente na formação de pápula e eritema. No entanto, estas reações são respostas inflamatórias não específicas, que não são mediadas por IgE, podendo ser resultado de extratos de alérgenos irritantes (DeBoer, Moriello, & Cooley, 1991) que possuem uma concentração demasiado elevada, da prática de técnica inadequada ou ainda da realização de teste intradérmico em pele irritada. Neste último caso, qualquer reação positiva ao controlo negativo invalida a totalidade do teste intradérmico (Hillier & DeBoer, 2001). Conclui-se portanto que a concentração de 200 µg/ml de extrato de alérgenos de *S. pseudintermedius* utilizada neste projeto é irritante, tendo uma concentração demasiado elevada, o que leva ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória não específica por parte do animal testado. Assim sendo, esta concentração não deve ser utilizada em testes dermatológicos cutâneos com o objetivo de prevenir a ocorrência deste tipo de reações. Assim, dentro das concentrações testadas a concentração de extrato de *S. pseudintermedius* que deve ser utilizada nos testes intradérmicos de pacientes atópicos é a de 20 µg/ml, pois trata-se da concentração mais elevada que não causou uma reação positiva em mais de 10% dos animais; nos animais saudáveis testados incluídos no grupo controlo apenas 1 dos canídeos demonstrou uma ligeira reação positiva, o que reflete 4,5% do total da amostra populacional (n=23), estando este valor abaixo do indicado na literatura (> 10%). De ressaltar, que este animal pertencia a um canil e por estar neste tipo de ambiente não foi possível obter uma história clínica pormenorizada. Contudo, na história clínica apurada não havia referência de presença de prurido (esporádico ou permanente) ou de lesões cutâneas de origem bacteriana. A citologia cutânea realizada apresentava alguns cocos extracelulares e células de descamação, não havendo os sinais citológicos característicos de infeção bacteriana, como por exemplo células inflamatórias degeneradas e cocos intracelulares.

Em 2002 foram realizados dois estudos em que se avaliava a reatividade cutânea a alérgenos de *Malassezia pachydermatis* em TID. Os extratos utilizados foram previamente testados em animais saudáveis, utilizando as mesmas concentrações que foram utilizadas neste projeto. Em ambos os estudos a concentração de 200 µg/ml não foi considerada irritante, uma vez que apenas 1 em 19 beagles saudáveis demonstrou reatividade imediata a esta concentração (Bond, Curtis, et al., 2002; Bond, Patterson-Kane, et al., 2002). Já em 2010, um estudo realizado em Portugal também referente à sensibilização à *Malassezia pachydermatis* na DAC, realizou TID em 9 animais saudáveis utilizando extrato de alérgenos de *Malassezia pachydermatis* nas seguintes concentrações 200 µg/ml, 100 µg/ml, 70 µg/ml e 20 µg/ml. As concentrações de 200 µg/ml e de 100 µg/ml foram consideradas irritantes, tendo dado origem a provas cutâneas positivas em 4 animais saudáveis e em 1 animal saudável, respetivamente (Lourenço, 2010).

No início do projeto, para a realização dos testes intradérmicos decidiu-se sedar todos os animais, incluindo os canídeos pertencentes ao grupo controlo. No entanto, como este exame era constituído por uma bateria de apenas cinco injeções intradérmicas e após a realização de alguns testes em cães não sedados, que não demonstraram desconforto durante o procedimento e que apresentaram reatividade cutânea após as administrações intradérmicas, considerou-se não haver necessidade de continuar a realizar a sedação dos canídeos saudáveis. A sedação era um fator limitante na adesão de participação voluntária e, após esta decisão foi mais fácil obter aceitação por parte dos proprietários. Esta decisão está também prevista na literatura de referência que salienta que os TID podem ser realizados em animais não sedados desde que o procedimento não origine *stress* que pode resultar numa hipercortisolemia, afetando negativamente a reatividade da pele (Hillier & DeBoer, 2001).

### **3. Determinação da prevalência de hipersensibilidade bacteriana em animais atópicos**

#### **3.1 Materiais e Métodos**

##### **3.1.1 Seleção dos animais do grupo experimental**

Os animais incluídos no grupo experimental foram selecionados nas consultas de Dermatologia do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL). Este grupo era constituído por 24 canídeos diagnosticados com DAC, tendo sido excluídas todas as outras causas de prurido. Como critério de inclusão obrigatório, estes animais tinham de apresentar história clínica de infeção cutânea bacteriana recorrente, sendo o agente etiológico responsável pela infeção da atualidade o *S. pseudintermedius*, comprovado pelos seguintes meios de diagnóstico: citologia cutânea e, quando possível, cultura bacteriana e PCR.

À semelhança dos animais do grupo de controlo, os canídeos incluídos no grupo experimental tiveram de respeitar todos os critérios de inclusão estabelecidos para este grupo (Tabela 8). Para análise posterior, todos os proprietários forneceram os dados de toda a história clínica do animal (Anexo II). O uso de animais nesta fase do estudo foi também autorizado pela CEBEA da FMV – UL e cada proprietário assinou um termo de autorização, após esclarecido todo o procedimento (Anexo I).

Tabela 8: Critérios de inclusão delineados para o grupo experimental.

Critérios de inclusão
Animais com idade superior ou igual a 1 ano
Sem raça ou sexo específico
História clínica de prurido constante ou sazonal
Diagnóstico clínico de DAc, exclusão de todas as outras causas de prurido
História clínica de, pelo menos, 2 episódios de piodermite
Citologia cutânea característica de infecção bacteriana por cocos e, quando possível, cultura bacteriana e PCR
Controlo adequado de ectoparasitas
Privação farmacológica de anti-histamínicos e corticosteróides, no mínimo, nos 15 dias que antecedem os testes intradérmicos

Em relação aos canídeos incluídos no grupo experimental, a sua história clínica foi avaliada de modo a determinar quantas infeções cutâneas cada animal apresentou, quais os exames de diagnóstico e tratamentos utilizados de forma a tentar identificar qual o agente responsável por estas infeções. Apenas os cães que apresentaram duas ou mais infeções cutâneas foram aceites para integrar o estudo. Quando estes animais se apresentaram à consulta de dermatologia do hospital escolar da FMV-UL foi realizado um exame dermatológico minucioso, onde se recolheu amostras para a realização de citologias cutâneas e culturas bacterianas de forma a determinar qual o agente etiológico responsável pela última infeção apresentada pelo animal. Os animais incluídos no estudo apresentavam lesões compatíveis com piodermite superficial (pápulas, pústulas, colaretes epidérmicos e crostas), otite bacteriana ou otite e/ou dermatite mista (cocos e *Malassezia* spp.).

### 3.1.2 Citologia cutânea e/ou auricular

À semelhança do que foi realizado para os canídeos do grupo controlo, a recolha das amostras para a citologia cutânea foi escolhida consoante o tipo e o local anatómico da lesão que os animais atópicos apresentavam. A interpretação da citologia cutânea e/ou auricular teve como critério a observação de cocos intracelulares em células inflamatórias e a observação de polimorfonucleares neutrófilos degenerados, considerando-se nestes casos a citologia compatível com piodermite ou otite bacteriana, sendo o agente mais provável o *S. pseudintermedius*. Quando na citologia, além das bactérias do tipo cocos se observavam leveduras com “forma de amendoim” (*Malassezia* spp.) em número  $\geq 3$  por campo, na ampliação de imersão (x 1000), a infeção (piodermite ou otite) foi considerada mista.



### 3.1.3 Culturas bacterianas e PCR

Para a realização das culturas bacterianas fez-se a colheita das amostras com auxílio de uma zaragatoa estéril. Estas zaragatoas foram semeadas através de sementeira direta por estria na superfície de um meio sólido não seletivo (Agar Sangue). As placas de agar foram incubadas a 37°C durante 24 horas. Considerou-se um resultado positivo quando ocorreu crescimento de culturas predominantes ou puras. Para se determinar qual o agente bacteriano responsável pela infecção cutânea ou auricular teve-se em conta a morfologia das colónias, características de crescimento, morfologia microscópica com coloração de Gram e prova de catalase. Quando se identificou a presença de *Staphylococcus* spp., uma colónia foi semeada no meio Brilliance MRSA2 (Oxoid) de forma a identificar a resistência à metilicina. Para a identificação correta da espécie foi realizado PCR com a amplificação do gene *nuc* específico de cada espécie. Para os supostos *S. schleiferi*, *S. pseudintermedius* e *S. intermedius*, a amplificação do gene *nuc* foi realizada através de um multiplex-PCR, adaptado do protocolo descrito por Sasaki *et al.* (2010). O PCR foi realizado com um volume final de 50 µl contendo água, tampão, cloreto de magnésio (25 mM), dNTPs (25 mM cada), primers sch F, sch R, int F e int R, os primers Pse F (10 pmol/µl) e Pse R (10 pmol/µl), ADN e Dream Taq (Fermentas). A reação ocorrida no termociclador consistiu numa desnaturação inicial (2 minutos a 95°C) seguida de trinta ciclos de desnaturação (30 segundos a 95°C), hibridação (35 segundos a 56°C) e extensão (60 segundos a 72°C), ocorrendo posteriormente uma única extensão final (2 minutos a 72°C).

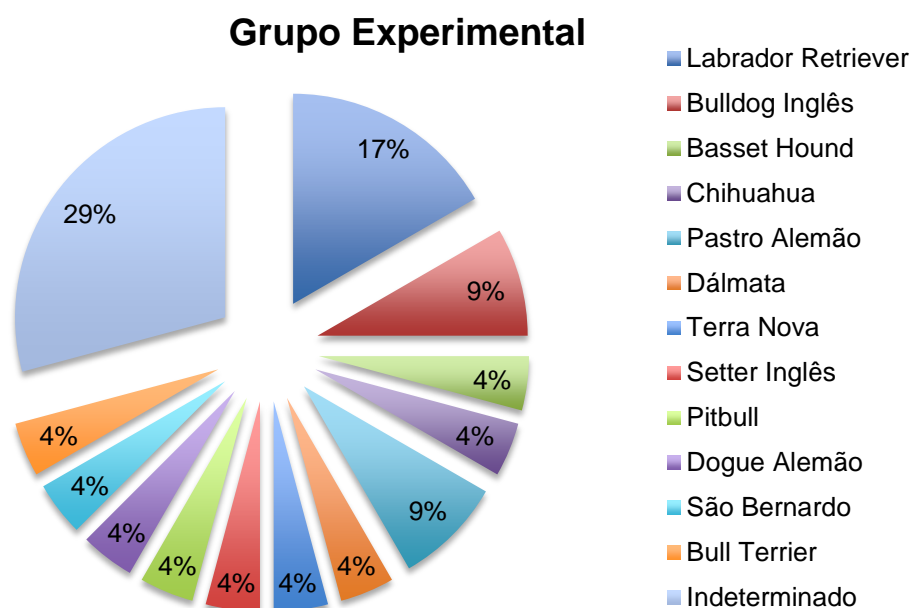
### 3.1.4 Testes intradérmicos

O procedimento realizado foi exatamente igual ao descrito no capítulo 2.1.3 Testes intradérmicos.

## 3.2 Resultados

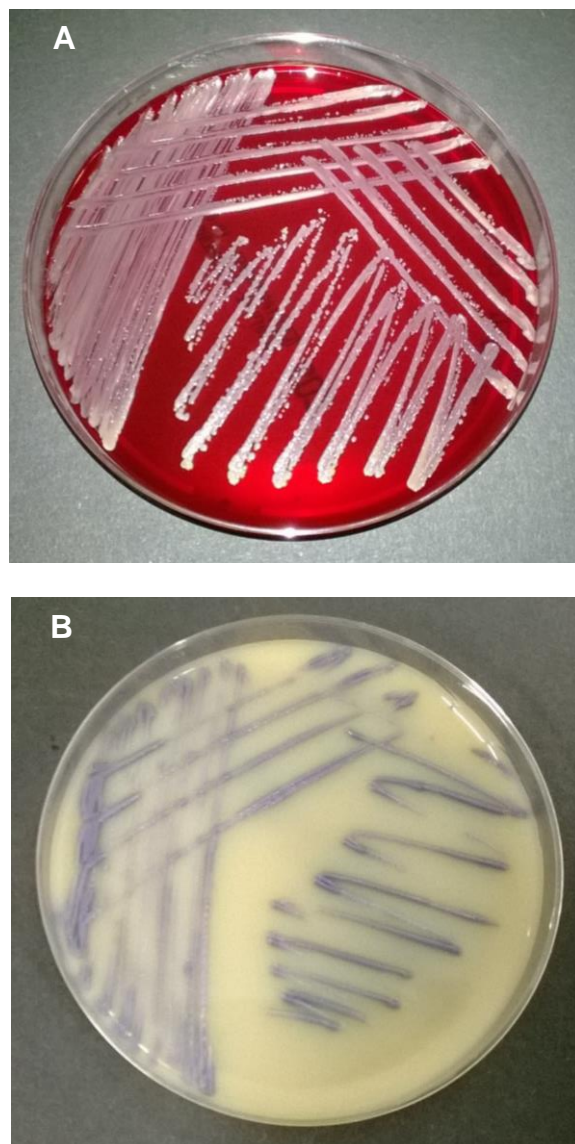
O grupo experimental era constituído por vinte e quatro canídeos, dos quais 16 eram machos e 8 eram fêmeas com idades compreendidas entre 1 e 10 anos, sendo a média de idades de 4,46 anos ( $\pm 2,63$ ). Neste grupo experimental diversas raças estavam representadas: Labrador Retriever, Bull Terrier, Pastor Alemão, Pitbull, Bulldog Inglês, Basset Hound, Chihuahua, Dálmata, Terra Nova, Setter Inglês, Dogue Alemão, São Bernardo. No entanto, também estavam presentes neste grupo cães de raça indeterminada (Gráfico 4).

Gráfico 4: Representatividade de raças no grupo experimental.



Para diagnóstico da mais recente infecção cutânea e/ou auricular e determinação do agente etiológico realizou-se citologia a todos os animais incluídos no grupo experimental (n=24). No entanto, apenas foram realizadas culturas bacterianas a 14 canídeos. Diagnosticou-se infecção cutânea bacteriana em 8 canídeos através de citologia cutânea, em que se verificaram a presença de bactérias do tipo cocos intracelulares e a presença de polimorfonucleares neutrófilos degenerados, sendo o agente mais provável o *S. pseudintermedius*. Dois canídeos foram diagnosticados com infecção cutânea mista, na citologia cutânea além de cocos intracelulares observaram-se também *Malassezia* spp. em número  $\geq 3$  por campo, na ampliação de imersão (x 1000). Aos restantes 14 animais, além da citologia cutânea e/ou auricular realizada que apresentava sinais citológicos de infecção bacteriana, foram também recolhidas amostras para a realização de culturas bacterianas. Todas as culturas foram positivas para *Staphylococcus* spp.. No meio Brilliance MRSA2 houve apenas 5 culturas com resultados positivos para estafilococos resistentes à meticilina, nas restantes culturas não se observou crescimento bacteriano. Posteriormente foi realizado PCR a estas amostras para identificação da espécie. Em 10 das 14 amostras identificou-se *S. Pseudintermedius*, enquanto nas outras 4 amostras não foi possível identificar os estafilococos à espécie.

Figura 13: **A** – Aspetto de colónias de *Staphylococcus* spp. em meio Ágar Sangue; **B** – Aspetto de colónias de MRSP em meio Brilliance MRSA2. (Fotografias gentilmente cedidas pela Dra. Natacha Couto)



Dos vinte e quatro canídeos atópicos testados na segunda fase do projeto (n=24), dezoito (75%) apresentaram reação positiva ao extrato de MRSP na concentração de 200 µg/ml, sendo que estas reações variaram entre as classificações 2 (++) e 3 (+++). Das 18 reações positivas que se verificaram na maior concentração, dez foram reações positivas de classificação 3 (+++) e oito de classificação 2 (++) . Pelo contrário, considerando a concentração de 20 µg/ml apenas quatro canídeos (16,7%) exibiram reações positivas ligeiras, ou seja, de classificação 2 (++) . A concentração de 2 µg/ml não deu origem a nenhuma reação positiva (Gráfico 5).

Gráfico 5: Resultados obtidos nas três concentrações de extrato de *S. pseudintermedius* nos animais do grupo experimental.

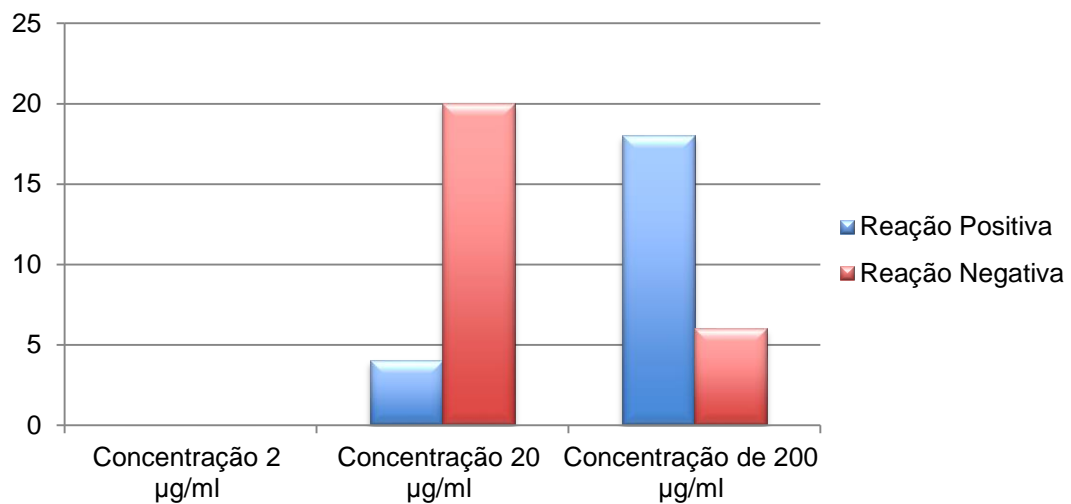
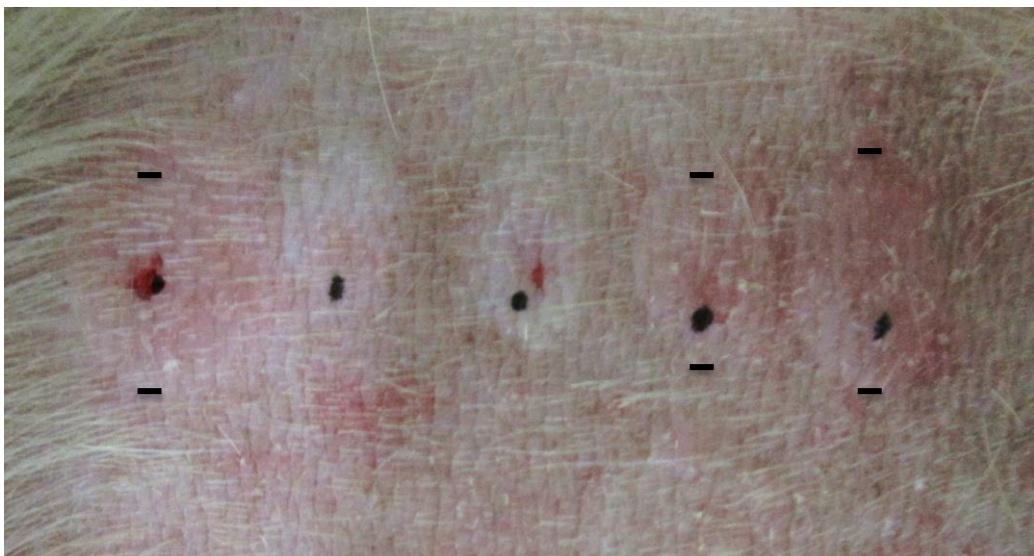


Figura 14: Resultado de um teste intradérmico ao extrato de *S. pseudintermedius* realizado num canídeo do grupo experimental (Fotografia gentilmente cedidas pela Dra. Natacha Couto).



Legenda: Cada ponto preto corresponde ao local de administração, da esquerda para a direita, do controlo positivo, controlo negativo, extrato de *S. pseudintermedius* na concentração de 2 µg/ml, 20 µg/ml e 200 µg/ml. A reação positiva observada na concentração de 200 µg/ml de extrato de *S. pseudintermedius* corresponde a uma reação de classificação 3 (+++), enquanto que a reação positiva observada na concentração de 20 µg/ml corresponde a uma reação de classificação 2 (++)

Tabela 9: Resultados obtidos nos TID dos 24 canídeos incluídos no grupo experimental, após administração das três concentrações do extrato de *S. pseudintermedius*.

Nº	Controlo Positivo	Controlo Negativo	Concentração 2 ug/ml	Concentração 20 ug/ml	Concentração 200 ug/ml
1	++++	0	0	0	+++
2	++++	0	0	0	++
3	++++	0	0	0	+++
4	++++	0	0	0	+++
5	++++	0	0	0	+++
6	++++	0	0	++	+++
7	++++	0	0	0	++
8	++++	0	0	++	+++
9	++++	0	0	0	++
10	++++	0	0	0	++
11	++++	0	0	++	+++
12	++++	0	0	0	++
13	++++	0	0	+	+++
14	++++	0	0	++	+++
15	++++	0	0	+	+++
16	++++	0	0	0	++
17	++++	0	0	0	++
18	++++	0	0	0	++
19	++++	0	0	0	0
20	++++	0	0	0	0
21	++++	0	0	0	0
22	++++	0	0	0	0
23	++++	0	0	0	0
24	++++	0	0	0	0

### 3.3 Discussão

De acordo com as conclusões apuradas na primeira fase deste estudo, utilizou-se inicialmente a concentração de 20 µg/ml do extrato de alérgenos de *S. pseudintermedius* para realizar os testes intradérmicos em canídeos com DAC, com o objetivo de determinar a frequência de hipersensibilidade ao *S. pseudintermedius* em cães atópicos com infeção bacteriana recorrente.

No entanto, foram detetados 2 problemas basilares: em primeiro lugar, mesmo a concentração de 200 µg/ml considerada potencialmente irritante e causadora de respostas falso-positivas deixou de o ser em grande parte dos “lotes” de extrato de *S.*

*pseudintermedius* que foram fornecidos para a realização do estudo, não havendo qualquer reação mensurável da parte dos animais atópicos aquando do teste cutâneo com esta concentração; em segundo lugar, animais atópicos que apresentavam um historial clínico muito concordante com uma possível hipersensibilidade bacteriana, também não apresentaram qualquer reação mensurável na concentração de 20 µg/ml, sendo que alguns destes animais nem apresentaram qualquer reação à concentração de 200 µg/ml. Tornou-se então evidente que era necessário averiguar a viabilidade do extrato, de forma a validar estas reações obtidas nos TID de animais atópicos. Para isso, foram realizados TID em animais saudáveis já anteriormente testados, e nos quais obtivemos reações claramente positivas na concentração de 200 µg/ml no primeiro teste realizado. No segundo teste, os resultados obtidos nesta concentração foram negativos. Assim sendo, não foi possível determinar se algumas das reações negativas verificadas em animais do grupo experimental, e provavelmente também em animais do grupo controlo, nas 3 concentrações de extrato de *S. pseudintermedius* possam ter-se devido à instabilidade do extrato ou devido à não reatividade ao alergénio. Estes factos tornaram então explícito que o extrato de alergénios de *S. pseudintermedius* utilizado era um grande fator limitante deste estudo, uma vez que não permitia alcançar reprodutibilidade e uniformidade nos resultados obtidos, conduzindo potencialmente a um aumento do número de reações consideradas falso-negativas. Esta situação veio impossibilitar a capacidade de cumprir o segundo objetivo deste estudo, uma vez que foi impossível identificar a existência ou não de reações de hipersensibilidade. As reações cutâneas obtidas nos testes intradérmicos eram impossíveis de interpretar uma vez que podiam representar verdadeira falta de reatividade aos alergénios do *S. pseudintermedius* ou serem apenas reações falso-negativas.

A necessidade de padronizar os extratos de alergénios tem sido constatada desde a introdução dos testes dermatológicos cutâneos em 1873. Contudo, o problema tornou-se mais urgente com a introdução da dessensibilização em 1911 (Platts-Mills, Rawle, & Chapman, 1985). Esta padronização é essencial não só para controlar a variabilidade das respostas obtidas nos TID, como para alcançar consistência e reprodutibilidade em ambiente clínico (Larsen & Dreborg, 2008) e, assim melhorar da qualidade dos resultados obtidos (van Ree et al., 2008). Em medicina veterinária, os extratos de alergénios são grosseiramente padronizados tendo como base o peso/volume (p/v) ou as unidades de azoto proteico/mililitro (PNU/ml) (Hillier & DeBoer, 2001). Ambos os métodos são fracos indicadores do conteúdo de alergénios presentes no extrato (Hillier & DeBoer, 2001). A quantidade proteica não está necessariamente relacionada com a quantidade de alergénios presentes no extrato (Baer, Godfrey, Maloney, Norman, & Lichtenstein, 1970), e os níveis de alergénios *major* podem variar mais de 100 vezes em extratos não padronizados (Bousquet, Lockey, & Malling, 1998). Num sentido mais amplo, a padronização inclui controlar todo o processo de produção do extrato, desde a fonte de matéria-prima que dá origem aos

alergénios a todos os procedimentos incluídos na sua produção (Larsen & Dreborg, 2008). A formação do complexo alergénio-IgE envolve a ligação entre a superfície molecular do alergénio e a superfície molecular do anticorpo IgE, para isso estas duas superfícies necessitam de se encaixar na perfeição (Grier, 2001). Tanto os epítomos do alergénio como os locais de ligação do anticorpo são vulneráveis de sofrer alterações que podem comprometer a capacidade de se formar este complexo alergénio-IgE, e assim comprometer os resultados obtidos nos TID (Grier, 2001). Assim sendo, os procedimentos de extração e armazenamento dos extratos de alergénios devem respeitar certas condições, de modo a permitir um isolamento de estruturas proteicas sem que ocorra desnaturação e alteração da sua conformação (Hradilavá, Weigl, & Raska, 2000). Desta forma, é necessário durante a produção e armazenamento do extrato controlar fatores externos que possam levar a estas ou outras alterações:

- ❖ Cultura – para a realização de extratos de alergénios de fungos recomenda-se que os diferentes lotes de extratos devem derivar de culturas independentes da mesma estirpe, de forma a assegurar uma composição constante. Ainda assim, esta composição pode variar, mesmo sob condições de crescimento aparentemente semelhantes. O meio de cultura deve ser sintético ou desprovido de componentes que possam servir de alergénios. A cultura deve ser realizada sob condições assépticas, para reduzir o risco de contaminação com outros microrganismos e devem ser realizados posteriormente testes de esterilidade do extrato para assegurar que não estão presentes bactérias viáveis que possam levar a infeção (Larsen & Dreborg, 2008). À semelhança do que é recomendado para os fungos, os alergénios bacterianos utilizados neste estudo foram obtidos sempre a partir da mesma estirpe bacteriana (estirpe 5819/10) e as condições de crescimento foram o mais semelhante possível entre culturas, ainda assim é impossível garantir que a composição proteica extraída não varie.
- ❖ Processo de extração – as próprias condições em que decorre a extração como o tempo de realização do procedimento, temperatura e pH podem levar à desnaturação proteica, com alteração da estrutura secundária e terciária da proteína, nomeadamente alteração da apresentação dos epítomos, e consequentemente perda de função (Grier, 2001; Platts-Mills et al., 1985).
- ❖ Presença de proteases – a diminuição da atividade de extratos de ácaros e fungos pode ser causada pela presença de proteases nestas preparações (Hradilavá et al., 2000). Acredita-se que os extratos bacterianos podem também ter a sua atividade diminuída pela presença de proteases, pertencentes à própria bactéria, as quais quebram as ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas neutralizando-as.
- ❖ Estabilidade do produto – sabe-se que a eficácia dos extratos de alergénios diminui ao longo do tempo de conservação. A estabilidade destas preparações pode ser reforçada por um processo de liofilização ou pela preservação em 50% de glicerol. A liofilização é



o método preferido para a maioria dos alérgenos, no entanto os alérgenos de ácaros perdem grande parte da sua atividade durante este processo (Hradilavá et al., 2000). Por outro lado, a adição de fenol a estas preparações reduz a sua eficácia (Center, Shuller, & Zeleznick, 1974; Johnson, Schlegle, & Hampton, 1955). Um dos problemas verificados neste estudo foi o extrato ser instável e ter um tempo de conservação muito curto, o que implicava renová-lo com alguma frequência. Para tentar ultrapassar este problema, foi adicionado um excipiente de conservação à sua constituição, fenol a 1%. Mesmo assim não se verificaram alterações significativas nos resultados.

- ❖ Diluições – as diluições realizadas para obter diferentes concentrações de alérgenos podem também comprometer a viabilidade do extrato. Uma diminuição da atividade é geralmente mais rápida em extratos diluídos. Este fenómeno pode ser explicado pela adsorção de proteínas às paredes dos frascos onde estes extratos são armazenados. Por isso, é recomendado manter estas preparações a 4°C na maior concentração possível (Hradilavá et al., 2000). Extratos de alérgenos diluídos mantidos em recipientes de vidro podem ser armazenados em refrigeração no máximo por 8 semanas, enquanto que alérgenos diluídos podem ser mantidos em seringas de plástico por apenas 2 semanas (Hillier & DeBoer, 2001).
- ❖ Temperatura de armazenamento – foi realizado um estudo de 1 ano com extratos de alérgenos, de forma a observar o efeito da temperatura de armazenamento na atividade deste tipo de preparações. Este estudo conclui que não existe diferenças significativas na atividade do extrato ao preservá-lo durante 3 meses a temperaturas de 4°C ou 20°C; no entanto, se o tempo de armazenamento for de 12 meses, observa-se perda de atividade do extrato, se esta preparação não for preservada sempre a temperaturas de 4°C (Nelson, 1981). É recomendado que os extratos de alérgenos sejam armazenados a 4°C e que a congelação seja evitada (Hillier & DeBoer, 2001).

Como já foi referido, o extrato de alérgenos de *S. pseudintermedius* utilizado foi cedido pelo Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas da FMV-UL e como o protocolo de extração era confidencial, não foi possível e não fazia parte do âmbito deste projeto identificar quais os fatores que podem ter estado na origem da instabilidade do extrato. No entanto, as hipóteses anteriormente apresentadas são algumas das possibilidades que podem ter ocorrido para o extrato ter perdido viabilidade ao longo do decurso do estudo e não ter demonstrado uniformidade das reações apresentadas pelos animais testados. No futuro é necessário identificar a causa e melhorar o extrato, de forma a ser possível realizar mais estudo nesta área.

Ainda assim, analisando os resultados obtidos nesta segunda fase do projeto verificou-se que cerca de 17% dos cães atópicos incluídos no grupo experimental (n= 24) apresentaram reações imediatas positivas ao extrato de *S. pseudintermedius* na concentração de 20 µg/ml. Isto significa que, muito provavelmente, os alérgenos de *S.*



*pseudintermedius* presentes neste extrato induziram, em alguns canídeos, uma resposta de hipersensibilidade do tipo I, ocorrendo ligação destes alergénios a moléculas de IgE específicas e consequentemente desgranulação dos mastócitos, com formação de pápula e eritema no local de administração. Em medicina humana, os testes cutâneos são a técnica padrão recomendada para a deteção de reações de hipersensibilidade do tipo I contra aeroalergénios (Burbach et al., 2009). Para determinar a relevância clínica das reações positivas obtidas na concentração de 20 µg/ml, avaliou-se individualmente a história clínica de cada animal que apresentou esta reação. Os quatro animais tinham história clínica de 3 ou mais episódios de infeção cutânea e/ou auricular bacteriana. Dos quatro canídeos que apresentaram estas reações: em 3 deles identificou-se o agente bacteriano da última piodermite e/ou otite como MRSP, no outro canídeo apenas foi realizado uma citologia cutânea onde se observou sinais citológicos de infeção bacteriana, com cocos intracelulares e células inflamatórias degeneradas. Nesta avaliação, foi também considerada a resposta ao tratamentos com antibióticos e corticosteróides e o aumento do nível de prurido quando os canídeos apresentavam lesões associadas a infeção bacteriana. Tendo como base todos estes critérios, apurou-se que em apenas 1 dos canídeos as reações positivas apresentadas nos testes intradérmicos tinham relevância clínica.

Um teste cutâneo positivo identifica sensibilizações a um alergénio em particular, mas não determina a relevância clínica desta sensibilização (Burbach et al., 2009). Enquanto uma resposta negativa nestes testes cutâneos tem um excelente valor preditivo para a ausência de IgE específica para os alergénios testados, um teste cutâneo positivo não pode ser considerado como prova de uma alergia clinicamente relevante, mas apenas indica a presença de anticorpos IgE específicos para aquele alergénio (Burbach et al., 2009). Assim, a determinação da relevância clínica de testes cutâneos positivos depende de um diagnóstico de alergia por alergologistas experientes e da história clínica dos pacientes (Burbach et al., 2009). À semelhança, em medicina veterinária, a determinação do significado clínico das reações positivas em testes intradérmicos depende essencialmente da história clínica do animal. Esta avaliação não está isenta de incorreções, uma vez que sendo uma avaliação subjetiva o mais provável é conduzir a erros, como por exemplo determinar que a reação positiva é clinicamente relevante quando não é.

No caso do *S. aureus*, a via mais provável de sensibilização é através da pele (Reginald et al., 2011). No caso do cão também está demonstrado que a via mais importante de exposição aos alergénios é a via percutânea (Marsella et al., 2006). De facto, sabe-se que pessoas que sofrem de formas graves de DA mostram mais frequentemente IgE específica para antigénios bacterianos em relação aos pacientes com sintomatologia ligeira de DA e, portando, é possível que pacientes com alterações cutâneas mais graves estejam em contacto com um maior número de antigénios bacterianos, o que impulsiona a produção de IgE anti-estafilococos (Reginald et al., 2011). À semelhança do que ocorre nas pessoas, a

infecção por estafilococos, e em particular o *S. pseudintermedius*, está associada a uma maior gravidade da DAc (Lourenço, 2010), e pensa-se que os mecanismos fisiopatológicos que levam a este agravamento sejam os mesmos que se verificam para o *S. aureus*. Supõem-se que no cão, também ocorra uma diminuição de AMP e alterações na barreira cutânea que levam a um aumento da penetração de antigénios do *S. pseudintermedius* e consequentemente ao aumento da produção de IgE específica. Um estudo realizado em 2013 demonstrou que cães que sofrem de DAc possuem níveis significativamente mais elevados de IgE anti-*S. pseudintermedius* quando comparados com animais saudáveis (Bexley et al., 2013). Para reforçar esta ideia, o nosso estudo veio demonstrar que parece existir uma resposta de hipersensibilidade imediata mediada por IgE quando se administram por via intradérmica componentes de *S. pseudintermedius*, o que pode originar a uma cascata de acontecimentos imunológicos que perpetuam a resposta inflamatória cutânea.

A DAc influencia de forma negativa e profunda não só a qualidade de vida dos canídeos afectados por esta doença, como também a dos seus proprietários. A qualidade de vida dos proprietários de cães atópicos é afectado de várias formas pela doença e é significativamente correlacionada com a gravidade clínica da DAc (Linek & Favrot, 2010). Assim sendo, é fundamental controlar as infeções por estafilococos secundárias a esta doença de modo a tentar diminuir a gravidade da DAc e diminuir o prurido, sendo que este último é uma das maiores preocupações dos proprietários (Linek & Favrot, 2010). A prescrição sistemática de antibioterapia para cada canídeo com DA não é recomendado, uma vez que o uso rotineiro de antibióticos pode levar ao aumento da prevalência de microrganismos resistentes aos antibióticos (Olivry et al., 2010). Devido a preocupações semelhantes, a recomendação de antibioterapia sistémica ou tópica intermitente (ou seja, terapêutica pulsátil) deve ser uma exceção e ser considerada apenas em casos de infeções recorrentes que não podem ser geridos por quaisquer outros meios (Olivry et al., 2010). Uma vez que as infeções cutâneas provocadas pelo *S. pseudintermedius* parecem exacerbar a resposta inflamatória e o prurido e consequentemente aumentar o desconforto do animal, uma dessensibilização com extrato de *S. pseudintermedius* pode ser uma alternativa futura viável para substituir as antibioterapias prolongadas e assim controlar de forma eficaz as piodermites bacterianas associadas à DAc.

#### 4. Conclusão e Perspetivas Futuras

Para ser possível realizar novos estudos nesta área, é necessário em primeiro lugar melhorar a qualidade do extrato de forma a poder ser usado em ambiente clínico e produzir resultados reprodutíveis e uniformes. Posteriormente, seria adequado voltar a testar este extrato e confirmar se a concentração de 20 µg/ml é realmente a concentração ideal a ser utilizada nos testes intradérmicos de animais atópicos. Mesmo assim, com este projeto conclui-se que alguns canídeos atópicos que apresentam infeção cutânea recorrente parecem apresentar hipersensibilidade imediata quando estimulados com extratos de alérgenos de *S. pseudintermedius*. Isto significa que, estes animais podem apresentar IgE anti-*S. pseudintermedius*, que pode vir a desencadear uma resposta inflamatória, exacerbando a gravidade da DAC. Assim sendo, é fundamental controlar estas infeções bacterianas secundárias de modo a conseguir melhorar a qualidade de vida destes animais. No futuro, será interessante não só determinar a prevalência desta hipersensibilidade entre os canídeos atópicos, como determinar quais os alérgenos *major* do *S. pseudintermedius* que levam ao desenvolvimento desta hipersensibilidade, de modo a ser possível encontrar uma alternativa na terapêutica destas infeções recorrentes. Os longos e repetidos períodos de antibioterapia sistémica ou tópica que caracterizam os tratamentos destas infeções, são atualmente uma preocupação entre a comunidade veterinária, devido ao aparecimento abrupto de estirpes de estafilococos resistentes aos antibióticos. Desta forma, uma dessensibilização ao *S. pseudintermedius* através de imunoterapia pode ser uma alternativa viável. No entanto, mais estudos são necessários nesta área.

#### IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Baer, H., Godfrey, H., Maloney, C. J., Norman, P. S., & Lichtenstein, L. M. (1970). The potency and antigen E content of commercially prepared ragweed extracts. *J Allergy Clin Immunol*, 45, 347 - 354.
- Bannerman, T. L. (2003). *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other Gram- positive cocci that grow aerobically *Manual of Clinical Microbiology* (pp. 384 - 404): Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Bannoehr, J., & Guardabassi, L. (2012). *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary Dermatology*, 23, 253 - e252. doi: 10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x
- Bannoehr, J., Zakour, N. L. B., Waller, A. S., Guardabassi, L., Thoday, K. L., van den Brock, A. H. M., & Fitzgerald, J. R. (2007). Population Genetic Structure of the *Staphylococcus intermedius* Group: Insights into agr Diversification and the Emergence of Methicillin-Resistant Strains. *Journal of Bacteriology*, 189, 8685 - 8692. doi: 10.1128/JB.01150-07
- Beale, K. M., Kunkle, G. A., Chalker, L., & Cannon, R. (1990). Effects of sedation on intradermal skin testing in flea-allergic dogs. *J. Am. Vet Med Assoc.*, 197, 861 - 864.
- Beco, L., Guaguère, E., Lorente Méndez, C., Noli, C., Nuttal, T., & Vroom , M. (2013). Suggested guidelines for using systemic antimicrobials in bacterial skin infections (1): diagnosis based on clinical presentation, cytology and culture. *Veterinary Record*, 172, 72 - 78.
- Bemis, D. A., Jones, R. D., Frank, L. A., & Kania, S. A. (2009). Evaluation of susceptibility test breakpoints used to predict mecA-mediated resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. *J. Vet Diagn Invest*, 21, 53 -58.
- Bettini, M., & Vignali, D. A. (2009). Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 21, 612 - 618.
- Bexley, J., Nuttall, T. J., Hammerberg, B., Fitzgerald, J. R., & Halliwell, R. E. (2013). Serum anti-*Staphylococcus pseudintermedius* IgE and IgG antibodies in dogs with atopic dermatitis and nonatopic dogs. *Veterinary Dermatology*, 24(1), 19-24 e15-16. doi: 10.1111/j.1365-3164.2012.01109.x
- Beyan, J., Frank, L. A., Rohrbach, B. W., Burgette, L. J., Cain, C. L., & Bemis, D. A. (2012). Treatment outcomes of dogs with meticilin-resistant and meticilin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* pyoderma. *Veterinary Dermatology*, 23, 361 - 368.
- Boguniewicz, M., & Leung, D. Y. M. (1998). Atopic dermatitis. In E. Middleton, C. E. Reed, E. F. Ellis, N. F. Adkinson, J. W. Yunginger & W. W. Busse (Eds.), *Allergy Principles and Practice* (5th ed., pp. 1123-1134): Mosby Year Book, St. Louis.
- Bond, R., Curtis, C. F., Hendricks, A., Ferguson, E. A., & Lloyd, D. H. (2002). Intradermal test reactivity to *Malassezia pachydermatis* in atopic dogs. *Veterinary Record*, 150, 448-449.
- Bond, R., & Loeffler, A. (2012). What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *J. Small Animal Pract*, 53, 147 - 154.

- Bond, R., Patterson-Kane, J. C., & Lloyd, D. H. (2002). Intradermal test reactivity to *Malassezia pachydermatis* in healthy basset hounds and basset hounds with *Malassezia dermatitis*. *Veterinary Record*, 151, 105-109.
- Bousquet, J., Lockey, R., & Malling, H. J. (1998). Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol*, 102, 558 - 562.
- Brazis, P., & Pol, G. Guia de recolha de amostras em dermatologia. UNIVET. *espécies*, 2, 28 - 32.
- Burbach, G. J., Heinzerleng, L. M., Edenharter, G., Bachert, C., Bindslev-Jensen, C., Bonini, S., . . . Zuberbier, T. (2009). GA2LEN skin test study II: clinical relevance of inhalant allergen sensitizations in Europe. *Allergy*, 64, 1507 - 1515.
- Cain, C. L. (2013). Antimicrobial resistance in staphylococci in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 43(1), 19-40. doi: 10.1016/j.cvsm.2012.09.003
- Carlotti, D. N., & Costargent, F. (1994). Analysis of positive skin tests in 449 dogs with allergic dermatitis. *Eur. J. Comp. Anim. Pract.*, 4, 42 - 59.
- Center, J. G., Shuller, N., & Zeleznick, L. D. (1974). Stability of antigen in commercially prepared ragweed pollen extracts. *J Allergy Clin Immunol*, 54, 305.
- Chervet, L., Galichet, A., McLean, W. H., Chen, H., Suter, M. M., Roosje, P. J., & Muller, E. J. (2010). Missing C-terminal filaggrin expression, NFkappaB activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. *Exp Dermatol*, 19, e343 - e346.
- Cohn, L. A., & Middleton, J. R. (2010). A veterinary perspective on methicillin-resistant staphylococci. *J. Vet. Emerg Crit Care (San Antonio)*, 20, 31 - 45.
- Cork, M. J., Danby, S. G., Vasilopoulos, Y., Hadgraft, J., Lane, M. E., Moustafa, M., . . . Ward, S. J. (2009). Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J. Invest Dermatol*, 129, 1892 - 1908.
- Couto, N., Belas, A., Couto, I., Perreten, V., & Pomba, C. (2013). Genetic Relatedness, Antimicrobial and Biocide Susceptibility Comparative Analysis of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* from Portugal. *Microbiol Drug Resistance*.
- Couto, N., Pomba, C., Moodley, A., & Guardabassi, L. (2011). Prevalence of methicillin-resistant staphylococci among dogs and cats at a veterinary teaching hospital in Portugal. *Veterinary Record*.
- Cox, H. U., Hoskins, J. D., Newman, S. S., Foil, C. S., Tiurnwald, G. H., & Roy, A. F. (1988). Temporal study of staphylococcal species on healthy dogs. *Am J Vet Res*, 49, 747 - 751.
- Coyner, K. S. (2013). A emergência e prevalência de MRSA, MRSP e MRSS no homem e nos animais de companhia. *Veterinary Medicine, Julho/Agosto*, 25 - 32.
- Cree, R. G., & Noble, W. C. (1995). In vitro indices of tissue adherence in *Staphylococcus intermedius*. *Lett Appl Microbiol*, 20, 168 - 170.
- de Weck, A. L. (1995). What can we learn from the allergic zoo. *Int. Arch. Allergy and Immunology*, 107, 13 - 18.

- DeBoer, D. J., & Hill, P. B. (1999). Serum immunoglobulin E concentrations in West Highland White Terrier puppies do not predict development of atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 10, 275 - 281.
- DeBoer, D. J., & Hillier, A. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVI): laboratory evaluation of dogs with atopic dermatitis with serum-based "allergy" tests. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81, 277 - 287.
- DeBoer, D. J., & Hillier, A. (2001a). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81, 271-276.
- DeBoer, D. J., & Marsella, R. (2001b). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81, 239-249.
- DeBoer, D. J., Moriello, K. A., & Cooley, A. J. (1991). Immunological reactivity to intradermal dermatophyte antigens in cats with dermatophytosis. *Veterinary Dermatology*, 2, 59 - 67.
- Devriese, L. A., Vaucanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C., . . . Haesebrouck, F. (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 1569 - 1573.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15, 167 - 193.
- Ebner, S., Nguyen, V. A., Forstner, M., Wang, Y. H., Wolfram, D., Liu, Y. J., & Romani, N. (2007). Thymic stromal lymphopoietin converts human epidermal Langerhans cells into antigen-presenting cells that induce proallergic T cells. *J Allergy Clin Immunol*, 119, 982 - 990.
- Fartasch, M., Bassukas, I. D., & Diepgen, T. L. (1992). Disturbed extruding mechanism of lamellar bodies in dry non-eczematous skin of atopics. *Br J Dermatol*, 127, 221 - 227.
- Favrot, C., Steffan, J., Seewald, W., & Picco, F. (2010). A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology*, 21, 23 - 31. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00758.x
- Fazakerley, J., Crossley, J., McEwan, N. A., Carter, S. D., & Nuttal, T. (2010). in vitro antimicrobial efficacy of human beta-defensin 3 against *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy and atopic canine skin. *Veterinary Dermatology*, 21, 463 - 468.
- Fazakerley, J., Nuttall, T., Sales, D., Schmidt, V., Carter, S. D., Hart, C. A., & McEwan, N. A. (2009). Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. *Veterinary Dermatology*, 20(3), 179-184. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00745.x
- Forsythe, P. J., Hill, P. B., Thoday, K. L., & Brown, J. (2002). Use of computerized image analysis to quantify staphylococcal adhesion to canine corneocytes: does breed and body have any relevance to the pathogenesis of pyoderma? *Veterinary Dermatology*, 13.
- Fort, M. M., Cheung, J., Yen, D., Li, J., Zurawski, S. M., Lo, S., . . . Rennick, D. M. (2001). IL-25 induces IL-4, IL-5 and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*, 15, 985 - 995.

- Futagawa-Saito, K., Ba-Thein, W., Sakurai, N., & Fukuyasu, T. (2006). Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. *BMC Vet Res*, 2, 4.
- Grier, T. J. (2001). Laboratory Methods for Allergen Extract Analysis and Quality Control. *Clin. Rev. Allergy and Immunology*, 21, 111 - 140.
- Griffin, C. E., & DeBoer, D. J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81, 255-269.
- Hagel, I., Lynch, N. R., Perez, M., Di Prisco, M. C., Lopez, R., & Rojas, E. (1993). Modulation of the allergic reactivity of slum children by helminthic infection. *Parasite Immunology*, 15, 311 - 315.
- Hajek, V. (1976). *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 26, 401 - 408.
- Halliwell, R. (2006). Revised nomenclature for veterinary allergy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114(3-4), 207-208. doi: 10.1016/j.vetimm.2006.08.013
- Halliwell, R., & Schwartzman, R. M. (1971). Atopic disease in the dog. *Veterinary Record*, 89, 209 - 214.
- Hauschild, T., & Wójcik, A. (2007). Species distribution and properties of staphylococci from canine dermatitis. *Research in Veterinary Science*, 82, 1 - 6. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.04.004
- Herz, U., Bunikowski, R., & Renz, H. (1998). Role of T cells in atopic dermatitis. New aspects on the dynamics of cytokine production and the contribution of bacterial superantigens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 115, 179 - 190.
- Hillier, A., & DeBoer, D. J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81, 289-304.
- Hillier, A., & Griffin, C. E. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81, 147-151.
- Hradilavá, S., Weigl, E., & Raska, M. (2000). Allergen standardization. *Acta Univ. Palacki. Olomuc., Fac. Med.*, 143, 31 - 35.
- Hvid, M., Vestergaard, C., Kemp, K., Christensen, G. B., Deleuran, B., & Deleuran, M. (2011). IL-25 in atopic dermatitis: a possible link between inflammation and skin barrier dysfunction? *J Invest Dermatol*, 131, 150 - 157.
- Imokawa, G. (2009). A possible mechanism underlying the ceramide deficiency in atopic dermatitis: expression of a deacylase enzyme that cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. *J Dermatol Sci*, 55, 1 - 9.
- Inman, A. O., Olivry, T., Dunston, S. M., Monteiro-Riviere, N. A., & Gatto, H. (2001). Electron microscopic observations of stratum corneum intercellular lipids in normal and atopic dogs. *Vet Pathol*, 38, 720 - 723.
- Iyori, K., Hisatsune, J., Kawakami, T., Shibata, S., Murayama, N., Ide, K., . . . Nishifuji, K. (2010). Identification of a novel *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin gene and its prevalence in isolates from canines with pyoderma and healthy dogs. *FEMS Microbiology Lett.*, 312, 169 - 175.

- Jenssen, H., Hamil, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 491 - 511.
- Johnson, M. C., Schlegle, A. W., & Hampton, S. F. (1955). Studies on the optimum concentration of glycerine in the preparation and preservation of ragweed pollen extract. *J Allergy Clin Immunol*, 26, 429.
- Jones, H. E., Reinhardt, J. H., & Rimaldi, M. G. (1973). A clinical, mycological, and immunological survey for dermatophytosis. *Arch. Dermatology*, 108, 61 - 65.
- Jones, R. D., Kania, S. A., Rohrbach, B. W., Frank, L. A., & Bemis, D. A. (2007). Prevalence of oxacillin- and multidrug- resistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1,772 samples (2001- 2005). *J. Am. Vet Med Assoc.*, 230, 221 - 227.
- Kawakami, T., Shibata, S., Murayama, N., Nagata, M., Nishifuji, K., Iwasaki, T., & Fukata, T. (2010). Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. coagulans isolated from dogs with pyoderma in Japan. *J. Vet. Med. Sci*, 72, 1615 - 1619.
- Larsen, J. N., & Dreborg, S. (2008). Standardization of Allergen Extracts. *Methods in Molecular Medicine: Allergy Methods and Protocols*, 133 - 145.
- Leung, D. Y. M. (1995). Atopic dermatitis: the skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 96, 302 - 319.
- Leyden, J. J., Marples, R. R., & Kligman, A. M. (1974). *Staphylococcus aureus* in the lesions of atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*, 90, 525 - 530.
- Linek, M., & Favrot, C. (2010). Impact of canine atopic dermatitis on the health-related quality of life of affected dogs and quality of life of their owners. *Veterinary Dermatology*, 21, 456 - 462.
- Loeffler, A., Linek, M., Moodley, A., Guardabassi, L., Sung, J. M., Winkler, M., . . . Lloyd, D. H. (2007). First report of multiresistant, mecA-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Veterinary Dermatology*, 18, 412 - 421.
- Lourenço, A. M. (2010). *Contribuição para o estudo da dermatite atópica canina na área metropolitana de Lisboa*. (Douturamento), Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Lourenço, A. M., Delgado, E., Neto, I., Peleteiro, M. C., Morais-Almeida, M., & Correia, J. H. D. (2010). Allergic conjunctivitis and conjunctival provocation tests in atopic dogs. *Veterinary Ophthalmology*.
- Lourenço, A. M., Peleteiro, M. C., Correia, J. H. D., & Morais-Almeida, M. (2010). Será o cão o melhor amigo de um atópico? – Considerações sobre o potencial dos modelos caninos para o estudo da dermatite atópica no homem. *Rev Port Imunoalergologia*, 18, 405 - 418.
- Macheleidt, O., Kaiser, H. W., & Sandhoff, K. (2002). Deficiency of epidermal protein-bound omega-hydroxyceramides in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 119, 166 - 173.
- Marsella, R., Nicklin, C., & Lopez, J. (2006). Studies on the role of routes of allergen exposure in high IgE-producing Beagle dogs sensitized to house dust mites. *Veterinary Dermatology*, 17, 306 - 312.



- Marsella, R., & Olivry, T. (2003). Animal models of atopic dermatitis. *Clinics in Dermatology*, 21(2), 122-133. doi: 10.1016/s0738-081x(02)00369-3
- Marsella, R., Olivry, T., & Carlotti, D. N. (2011). Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 22(3), 239-248. doi: 10.1111/j.1365-3164.2011.00967.x
- Marsella, R., & Samuelson, D. (2009). Unravelling the skin barrier: a new paradigm for atopic dermatitis and house dust mites. *Veterinary Dermatology*, 20(5-6), 533-540. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00809.x
- Marsella, R., Samuelson, D., & Doerr, K. (2010). Transmission electron microscopy studies in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 21, 81 - 88.
- Marsella, R., Samuelson, D., & Harrington, L. (2009). Immunohistochemical evaluation of filaggrin polyclonal antibody in atopic and normal Beagles. *Veterinary Dermatology*, 20, 547 - 553.
- Marsella, R., & Sousa, C. A. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIII): threshold phenomenon and summation of effects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81, 251 - 253.
- Marsella, R., Sousa, C. A., Gonzales, A. J., & Fadok, V. A. (2012). Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *J. American Veterinary Medical Association*, 241, 194 - 207.
- Mauldin, E. A. (2006). Skin Barrier Function and Canine Atopic DermatitisHill's Symposium on Dermatology (pp. 24 - 28): Palm Springs, CA.
- McEwan, N. A. (2000). Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine keratinocytes in atopic dermatitis. *Research in Veterinary Science*, 68, 279 - 283.
- Morris, D. O., Rook, K. A., & Shofer, F. S. (2006). Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). *Veterinary Dermatology*, 17, 332- 337.
- Nelson, H. S. (1981). Effects of preservatives and conditions of storage on the potency of allergy extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 67, 64 - 69.
- Nesbitt, G. H., Kedan, G. S., & Caciolo, P. (1984). Canine atopy, part I. Etiology and diagnosis. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 6, 73 - 84.
- Nuttal, T., Uri, M., & Halliwell, R. E. (2013). Canine atopic dermatitis - what have we learned? *Veterinary Record*, 201 - 207.
- Okudaira, H. (1998). Why atopic diseases prevail in developed countries. *Allergy Clin. Immunol. Int.*, 10, 110-114.
- Olivry, T. (2010). New diagnostic criteria for canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 21, 124 - 127.
- Olivry, T., DeBoer, D. J., Favrot, C., Jackson, H. A., Mueller, R. S., Nuttall, T., & Prelaud, P. (2010). Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 21(3), 233-248. doi: 10.1111/j.1365-3164.2010.00889.x

- Ong, P. Y., & Leung, D. Y. M. (2006). Immune dysregulation in atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep*, 6, 384 - 389.
- Palmer, C. N., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., . . . Lewis-Jones, S. (2006). Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet*, 38, 441 - 446.
- Patterson, R. (1959). Ragweed allergy in the dog. *J. American Veterinary Medical Association*, 135, 178 - 180.
- Patterson, R., Pruzansky, J. J., & Chang, W. W. Y. (1963). Spontaneous canine hypersensitivity to ragweed. Characterization of serum factor transferring skin, bronchial and anaphylactic sensitivity. *J. Immunol*, 90, 35 - 42.
- Patterson, R., & Sparks, D. B. (1962). The passive transfer to normal dogs of skin reactivity, asthma and anaphylaxis from a dog with spontaneous ragweed pollen hypersensitivity. *J. Allergy*, 88, 262 - 288.
- Picco, F., Zini, E., Nett-Mattler, C., Naegeli, C., Bigler, B., Rufenacht, S., . . . Favrot, C. (2008). A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. *Veterinary Dermatology*, 19, 150 - 155. doi: 10.1111/j.1365-3164.2008.00669.x
- Platts-Mills, T. A. E., Rawle, F., & Chapman, M. D. (1985). Problems in Allergen Standardization. *Clin. Rev. Allergy and Immunology*, 3, 271 - 290.
- Prevost, G., Bouakham, T., Piemont, Y., & Monteil, H. (1995). Characterisation of a synergohymenotropic toxin produced by *Staphylococcus intermedius*. *FEBS Lett.*, 376, 135 - 140.
- Reedy, L. M., Miller, W. H., & Willemse, T. (1997). *Allergic Skin Diseases of the Dog and Cat* (2nd ed.). London, UK: W. B. Saunders.
- Reginald, K., Westritschnig, K., Werfel, T., Heratizadeh, A., Novak, N., Focke-Tejkl, M., . . . Valenta, R. (2011). IgE antibody reactivity to bacterial antigens in atopic dermatitis patients. *Clin. Exp Allergy*, 41, 357 - 369.
- Reiter, L. V., Torres, S. M. F., & Wertz, P. W. (2009). Characterization and quantification of ceramides in the non-lesional skin of canine patients with atopic dermatitis compared to controls. *Veterinary Dermatology*, 20, 260 - 266.
- Ruscher, C., Lubke-Becker, A., Semmler, T., Wleklinski, C. G., Paasch, A., Soba, A., . . . Walther, B. (2010). Widespread rapid emergence of a distinct methicillin- and multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) genetic lineage in Europe. *Veterinary Microbiology*, 144, 340 - 346.
- Ruscher, C., Lubke-Becker, A., Wleklinski, C. G., Soba, A., Wieler, L. H., & Walther, B. (2009). Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. *Vet. Microbiol*, 136, 197 - 201.
- Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A. D., & McLean, W. H. (2009). Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci.*, 122, 1285 - 1294.
- Santoro, D., Bunick, D., Graves, T. K., & Campbell, K. L. (2010). Expression and distribution of antimicrobial peptides in the skin of healthy beagles. *Veterinary Dermatology*, 22, 61 - 67. doi: 10.1111/j.1365-3164.2010.00911.x

- Santoro, D., Bunick, D., Graves, T. K., & Segre, M. (2013). Evaluation of canine antimicrobial peptides in infected and noninfected chronic atopic skin. *Veterinary Dermatology*(24), 39 - e10. doi: 10.1111/j.1365-3164.2012.01091.x
- Saridomichelakis, M. N., Koutinas, A. F., Gioulekas, D., & Leontidis, L. (1999). Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and the prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 69, 61 - 73.
- Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., & Hiramatsu, K. (2007). Reclassification of Phenotypically Identified *Staphylococcus intermedius* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 2770 - 2778. doi: 10.1128/JCM.00360-07
- Schauber, J., & Gallo, R. L. (2008). Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122, 261 - 266.
- Schwartzman, R. M. (1965). Atopic in the dog. In A. J. Rook & G. S. Walton (Eds.), *Comparative physiology and pathology of the skin* (pp. 557 - 559): Philadelphia: F. A. Davis Co.
- Scott, D. W. (1981). Observations on canine atopy. *J. Am. Anim. Hosp. Assn.*, 17, 91 - 100.
- Scott, D. W., MacDonald, J. M., & Schultz, R. D. (1978). Staphylococcal hipersensitivity in the dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assn.*, 14, 766 - 779.
- Scott, D. W., Miller, W. H., & Griffin, C. E. (2001). *Small Animal Dermatology* (6th ed.): W. B. Saunders, Philadelphia.
- Shimada, K., Yoon, J. S., Yoshihara, T., Iwasaki, T., & Nishifuji, K. (2009). Increased transepidermal water loss and decreased ceramides content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 20, 541 - 546.
- Simou, C., Thoday, K. L., Forsythe, P. J., & Hill, P. B. (2005). Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus score, treatment and gender. *Veterinary Dermatology*, 16, 385 - 391.
- Sousa, C. A., & Marsella, R. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (II): genetics factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81, 153 - 157.
- Terauchi, R., Sato, H., Hasegawa, T., Yamaguchi, T., Aizawa, C., & Maehara, N. (2003). Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus intermedius* and its local toxicity in dogs. *Veterinary Microbiology*, 94, 19 -29.
- Tizard, I. R. (2009). Helper T Cells and Their Response to Antigen *Veterinary Immunology an Introduction* (pp. 140 - 151): Saunders Elsevier.
- van Ree, R., Chapman, M. D., Ferreira, F., Vieths, S., Bryan, D., Cromwell, O., . . . Weber, B. (2008). The CREATE Project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. *Allergy*, 63, 310 - 326.
- Varardo, P. E., Kilpper-Balz, R., Bravaasco, F., Satta, G., & Schleifer, K. H. (1988). *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38, 436 - 439.
- Verhagen, J., Akdis, M., Traidl-Hoffmann, C., Schmid-Grendelmeier, P., Hijnen, D., Knol, E. F., . . . Akdis, C. A. (2006). Absence of T- regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *J Allergy Clin Immunol*, 117, 176 - 183.

- Vuong, C., Gotz, F., & Otto, M. (2000). Construction and characterization of an agr deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*, 68, 1048 - 1053.
- Werner, Y., Lindberg, M., & Forslind, B. (1987). Membrane-coating granules in "dry" non-eczematous skin of patients with atopic dermatitis. A quantitative electron microscopic study. *Acta Dermatol Venereol*, 67, 385 - 390.
- Wilkie, J. S., Yager, J. A., Eyre, P., & Parker, W. M. (1990). Morphometric analyses of the skin of dogs with atopic dermatitis and correlations with cutaneous and plasma histamine and total serum IgE. *Vet Pathol*, 27, 179 - 186.
- Willemse, A., & van den Brom, W. E. (1983). Investigations of the symptomatology and the significance of immediate skin test reactivity in canine atopic dermatitis. *Res. Vet. Sci.*, 34, 261 - 265.
- Wittich, F. W. (1941). Spontaneous allergy (atopy) in the lower animal; seasonal hay fever (fall type) in a dog. *J. Allergy*, 2, 247 - 251.
- Yarwood, J. M., & Schlievert, P. M. (2003). Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J. Clin. Invest.*, 122, 1620 - 1625. doi: 10.1172/JCI200320442

## ANEXO I. TERMO DE CONSENTIMENTO

---



Nome: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

Grupo Experimental ☐

Grupo Controlo ☐

### Termo de Consentimento

Eu, \_\_\_\_\_, proprietário/a do canídeo \_\_\_\_\_, declaro que aceito que o canídeo referido participe no estudo “Utilização de extrato de *Staphylococcus pseudintermedius* em testes dermatológicos cutâneos no cão – um estudo preliminar”, tendo sido informado e concordando com todos os procedimentos que vão ser realizados.

Lisboa, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do proprietário)

## ANEXO II. FICHA DE HISTÓRIA CLÍNICA



Proprietário: \_\_\_\_\_  
Nome: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_  
Sexo: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_  
Grupo Experimental ☐ Grupo Controlo ☐

### História Pgressa

Já teve problema dermatológicos? Sim ☐ Não ☐

Data (idade) em que notou o primeiro problema dermatológico: \_\_\_\_\_

Aparecimento da sintomatologia: Súbito ☐ Lento ☐

Há influência sazonal? Sim ☐ Não ☐

Se sim, qual a estação? \_\_\_\_\_

Onde começou o problema? \_\_\_\_\_

Qual o aspeto inicial? \_\_\_\_\_

Há prurido? Sim ☐ Não ☐ Quando? Constante ☐ Esporádico ☐

Escala de prurido (0 a 10):

Já teve infeção cutânea bacteriana? ☐ Sim ☐ Não ☐

Quantas vezes? <2 ☐ 2 ☐ >3 ☐

Quais os exames complementares realizados? \_\_\_\_\_

Quais os tratamentos prescritos? \_\_\_\_\_

Fez Antibioterapia? Sim ☐ Não ☐ Melhorou? Sim ☐ Não ☐

Já teve otites? Sim ☐ Não ☐ Quantas vezes? <2 ☐ 2 ☐ >3 ☐

Quais os exames complementares realizados? \_\_\_\_\_

Quais os tratamentos prescritos? \_\_\_\_\_

Fez antibioterapia? Sim ☐ Não ☐ Melhorou? Sim ☐ Não ☐

Existe contacto com outros animais? Sim ☐ Não ☐

Há outros animais ou pessoas com problemas de pele? Sim ☐ Não ☐

Descreva o meio ambiente do animal: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Já fez corticoterapia? Sim ☐ Não ☐ Melhorou? Sim ☐ Não ☐

Dono tem ideia da causa? O que piora o problema? \_\_\_\_\_

Faz controlo de ectoparasitas? Sim ☐ Não ☐

Se sim, Produto: \_\_\_\_\_ Períodicidade: \_\_\_\_\_

Dieta do animal: \_\_\_\_\_

Já utilizou dieta hipoalergénica? Sim ☐ Não ☐

Eficácia da dieta hipoalergénica: Melhorou ☐ Não melhorou ☐

É castrado/esterilizado? Sim ☐ Não ☐

Se sim, idade de castração? \_\_\_\_\_

Data, duração do último cio: \_\_\_\_\_

História Clínica Geral:

---

---

---

Atualmente toma alguma medicação? Sim ☐ Não ☐

Se sim, qual? \_\_\_\_\_

Observações Exame de Estado Geral:

---

---

---

Observações Exame Dermatológico:

---

---

---